

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program Biologie

Studijní obor Fyziologie živočichů – Neurobiologie

Katedra fyziologie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Bc. Kateřina Vondráková

Role endotelinových receptorů typu A a B v modelu fokální ischemie u mláďat laboratorního
potkana

The role of endothelin receptors type A and B in the model of focal cerebral ischemia in
immature rats

Školitel: Mgr. Grygoriy Tsenov, Ph.D.

Praha 2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím níže uvedených literárních zdrojů. Na získání a vyhodnocení určitých výsledků práce se podíleli doc. Pharm.Dr. Hana Kubová, Dr.Sc., RNDr. Ondřej Kuda, Ph.D. a Mgr. Grygoriy Tsenov, Ph.D.

V Praze dne

Kateřina Vondráková

Poděkování

Chtěla bych poděkovat především svému školiteli panu Mgr. Grygoriyovi Tsenovovi, Ph.D. za jeho čas, trpělivost, cenné rady a ochotu mne učit. Dále bych chtěla poděkovat panu MUDr. Přemyslu Jiruškovi, Ph.D., MUDr. Petru Fáberovi a Mgr. Lence Kletečkové za rady a podnětné připomínky a také bych chtěla vyjádřit díky paní laborantce Blance Čejkové za její pomoc, ochotu a trpělivost. Chtěla bych poděkovat také vedení oddělení Vývojové epileptologie AVČR za možnost provedení diplomové práce na tomto pracovišti.

Práce vznikla za finanční podpory GAČR v rámci projektu P304/11/P386 a P304/14/20613.

Abstrakt

Hypoxicko-ischemické poškození představuje nejčastější formu perinatálního poškození mozku, které novorozence ohrožuje na životě a často vede k trvalým neurologickým následkům. Využití endotelinového modelu fokální ischemie představuje jednu z možností detailního výzkumu mechanismů a důsledků fokální ischemie.

Protože aspekty fokální ischemie v nezralém mozku jsou nedostatečně prozkoumané, zaměřili jsme se na úlohu endotelinových receptorů (typu A a B) v modelu fokální ischemie navozené aplikací endotelinu-1 (ET-1) do hipokampu u mláďat laboratorního potkana.

Použití agonistů a antagonistů endotelinových (ET) receptorů v našich experimentech vedlo k zjištění, že aktivace ET_A receptorů způsobuje výrazný pokles krevního průtoku související s hypoxií a následnou degenerací neuronů. Na druhou stranu aktivace ET_B receptorů nevede k zmíněným změnám a ukazuje spíše na jejich modulační roli. Ischemie mimojiné způsobuje nárůst glutamátu, glutaminu, alaninu, taurinu a argininu, naším novým zjištěním byl pokles koncentrace inhibičních aminokyselin GABA a glycinu po ischemii.

Přínosem této práce jsou nové poznatky o průběhu fokální ischemie vyvolané aplikací ET-1 a následujících akutních změn v nezralém hipokampu. Výsledky ukazují na řadu odlišných efektů fokální ischemie v nezralém mozku, což považujeme za přínos jak pro experimentálně probíhající, tak i navazující klinické studie a jsou nesmírně důležité pro vývoj účinné léčby.

Klíčová slova

fokální ischemie, endotelin-1, ET_A receptor, ET_B receptor, regionální krevní průtok, saturace kyslíku, mikrodialýza, aminokyseliny, neurodegenerace, hipokampus, 12. denní potkan

Abstract

Hypoxic-ischemic insult is a most common form of perinatal brain damage that threatens a newborn's life and can lead to permanent neurological sequelae. However, detailed aspects of the cerebral ischemia in the immature brain stay unanswered.

We decide to use the model of focal cerebral ischemia induced by intrahippocampal endothelin-1 (ET-1) in 12-days-old rats. The knowledge about consequences of ET-1 induced ischemia and the role of endothelin receptors (ET_A and ET_B) in ischemia-induced consequences in immature brain are poor at present. Agonists and selective antagonists of the ET_A and ET_B receptors were used to determine the role of these receptors in the development of ischemia, changes in regional blood flow and tissue oxygenation, local changes of biochemical parameters and acute neuronal death.

Our results indicate, that activation of the ET_A receptors causes a strong decrease of the blood flow, induced related hypoxia and subsequent neuronal degeneration, whereas activation of ET_B receptors has likely modulatory role. Moreover, ischemia causes increase of excitatory amino acids concentration, whereas inhibitory amino acid, except taurine, decreased after ischemia. These facts provide new insights in a case of perinatal ischemia.

This thesis demonstrates the wide range of different effects of the focal ischemia in immature brain, which may contribute experimentally ongoing and clinical follow-up study, as well as the development of effective treatment.

Key words

focal ischemia, endothelin-1, ET_A receptor, ET_B receptor, regional blood flow, oxygen saturation, microdialysis, amino acids, neurodegeneration, hippocampus, 12 days old rat

Obsah

1	Úvod	1
2	Ischemie.....	2
2.1	Důsledky ischemie	3
2.2	Vliv ischemie na metabolismus mozku	5
2.2.1	Energetický metabolismus.....	5
2.2.2	Aminokyseliny a jejich produkty.....	6
3	Modely.....	8
3.1	Modelová zvířata.....	8
3.1.1	Rozdíly mezi dospělým a nezralým mozkem u laboratorního potkana	9
3.1.2	Cévní zásobení mozku potkana	9
3.2	Modely ischemie	10
4	Endoteliny	13
4.1	Izoformy endotelinů	13
4.2	Syntéza endotelinů	15
4.3	Role endotelinů	16
5	Receptory.....	18
5.1	Typy endotelinových receptorů.....	18
5.2	Mechanismy signální trasdukcce endotelinových receptorů	21
5.3	Regulace syntézy endotelinů a exprese endotelinových receptorů	21
5.4	Role endotelinu-1 při cévní mozkové příhodě	23
5.5	Farmakologie endotelinových receptorů.....	23
5.5.1	Agonisté endotelinových receptorů	24
5.5.2	Antagonisté endotelinových receptorů	25
	Shrnutí.....	27
	Hypotéza, Cíle práce.....	29
6	Metodika.....	30
6.1	Experimentální zvířata	30
6.2	Použité látky.....	30
6.3	Chirurgický zákrok.....	31

6.4	Histologie	32
6.4.1	Barvení podle Nissla	33
6.4.2	Fluoro-Jade B barvení.....	33
6.5	Použité metody.....	34
6.5.1	Měření saturace kyslíku v tkáni	34
6.5.2	Měření regionálního krevního průtoku	34
6.5.3	Mikrodialýza.....	35
7	Experimenty	36
7.1	Popis experimentálních postupů	36
	Experiment 1. Stanovení změn lokálního krevního průtoku po aplikaci nižších koncentrací vybraných látek	36
	Experiment 2. Stanovení role ET _A a ET _B receptorů při změnách lokálního krevního průtoku během fokální ischemie navozené aplikací ET-1.....	37
	Experiment 3. Stanovení role ET _A a ET _B receptorů při změnách saturace kyslíku během fokální ischemie navozené aplikací ET-1	37
	Experiment 4. Stanovení role ET _A a ET _B receptorů při změnách hladin metabolitů pomocí mikrodialýzy během fokální ischemie navozené aplikací ET-1	38
	Experiment 5. Analýza degenerujících neuronů pomocí Fluoro-Jade B barvení po fokální ischemii.....	39
7.2	Analýza a zpracování dat	39
7.2.1	Analýza měření RKP a pO ₂	39
7.2.2	Analýza mikrodialyzačních vzorků	40
7.2.3	Mikroskopie	41
7.2.4	Statistická analýza.....	41
8	Výsledky.....	42
	Experiment 1. Stanovení změn lokálního krevního průtoku po aplikaci nižších koncentrací vybraných látek	42
	Experiment 2: Stanovení role ET _A a ET _B receptorů při změnách lokálního krevního průtoku během fokální ischemie navozené aplikací ET-1 (40 pmol/1 µl).	43
	Experiment 3: Stanovení role ET _A a ET _B receptorů při změnách saturace kyslíku během fokální ischemie navozené aplikací ET-1 (40 pmol/1 µl).	44

Experiment 4. Stanovení role ET _A a ET _B receptorů při změnách hladin metabolitů pomocí mikrodialýzy během fokální ischemie navozené aplikací ET-1 (40 pmol/1 µl).	45
Experiment 5. Analýza degenerujících neuronů pomocí Fluoro-Jade B barvení po fokální ischemii	51
9 Diskuze	54
10 Závěr	61
11 Literatura	62
Webové zdroje	73
12 Přílohy	74
Příloha č. 1. Protokol barvení podle Nissla.....	74
Příloha č. 2. Protokol barvení Fluoro-Jade B	75
Příloha č. 3. Protokol přípravy vzorku na mikrodialýzu	76

Zkratky

4-Ala-ET-1 - [Ala^{1,3,11,15}]-ET-1

AK - aminokyselina

Glu - glutamát, angl. glutamate, L-glutamic acid

cAMP – cyklický adenosin monofosfát

cGMP – cyklický guanosin monofosfát

DAG – diacylglycerol

DMSO – dimethylsulfoxid

ECE – endotelin konvertující enzym, angl. endotelin converting enzyme

EEG – elektroencefalogram

EKG – elektrokardiogram

ET-1 – endotelin-1, angl. endothelin-1

ET_A – endotelinový receptor typu A

ET_B – endotelinový receptor typu B

IP3 – inositol-3-fosfát

NIH – národní institut (ústav) zdraví, angl. national institute of health

NO – oxid dusnatý, angl. nitric oxide

NOS – syntáza oxidu dusnatého, angl. nitric oxid syntase

PBS – fosfátový pufr, angl. phosphate buffered saline

PLA – fosfolipáza A

PLC – fosfolipáza C

pO₂ – saturace kyslíku v tkáni

RKP – regionální krevní průtok

SHR – spontánně hypertenzní potkani

TNF – tumor necrosis factor

WHO – světová zdravotnická organizace, angl. world health organisation

CMP - cévní mozková příhoda

MCAO - okluze střední cerebrální artérie, angl. middle cerebral artery occlusion

FJB - Fluoro-Jade B

ATP – adenosin trifosfát

GABA – kyselina γ -aminomáselná, angl. γ -aminobutyric acid

DG - *gyrus dentatus*

CA1 - *cornu ammonis* 1, oblast amonova rohu 1

CA3 - *cornu ammonis* 3, oblast amonova rohu 3

1 Úvod

Mozková tkáň má vysoký energetický obrat a velice propracovaný cévní systém zásobování krve, proto je jednou z nejcitlivějších tkání na poruchy tohoto systému. Nedostatek kyslíku a glukózy způsobuje již po několika minutách odumírání neuronů a nenávratné poškození.

U dospělého člověka v klidovém stavu proteče mozkovými hemisférami 40-60 ml krve na 100 g tkáně za minutu, což činí přibližně 15 % celkového minutového výdeje srdečního. U dítěte jsou fyziologické hodnoty klidového krevního průtoku téměř dvojnásobné. Hodnoty krevního průtoku kolísají v důsledku funkčního zatížení určitých mozkových oblastí. Při zvýšené aktivitě neuronů může krevní průtok vystoupat až na dvojnásobek klidové hodnoty. Věkem krevní průtok mozkovými cévami klesá kvůli zvyšování množství mozkové tkáně a stěn cév, snížené schopnosti vazodilatace a vazokonstrikce cév atd.

Cévní mozková příhoda (CMP) patří mezi tzv. civilizační onemocnění, které vzniká v důsledku poruch prokrvení mozku a postihuje především starší věkovou skupinu. CMP spolu s dalšími cerebrovaskulárními onemocněními představují v dnešním světě po ischemické chorobě srdeční 2. nejčastější příčinu smrti (*Murray & Lopez, 1997*). Cévní mozková příhoda postihne přibližně 15 milionů lidí po celém světě ročně, z toho třetina zemře a třetina má vážné trvalé následky (*podle WHO, 2002*). V Evropě na následky mozkové příhody zemře ročně na 650 000 lidí (*podle WHO, 2002*). Incidence CMP v České republice činí 250 příhod na 100 000 obyvatel za rok (*Goldmund & Mikulík, 2007*). Tato čísla jsou jedna z nejvyšších ve světě, a proto je problematika cévní mozkové příhody významnou oblastí zájmu klinických pracovišť a farmaceutických společností. Rizikovými faktory bývá např. ateroskleróza, vysoký krevní tlak, vysoká hladina cholesterolu, kouření, diabetes, srdeční onemocnění a v neposlední řadě dříve prodělaná cévní mozková příhoda.

Další rizikovou věkovou skupinou, u které je vysoká incidence CMP, je dětská populace. Riziko cévní mozkové příhody je nejvyšší v prvním roce života a vrcholí v perinatálním období (období krátce před porodem až 7 dní po porodu) a představuje jeden z nejzávažnějších inzultů způsobujících neurologické poškození až smrt u novorozenců, dětí

i adolescentů v USA. Perinatální cévní mozková příhoda se objevuje s četností 1:4 000 živě narozených dětí ročně (*Lynch & Nelson, 2001*). Pozdější důsledky ischemie v raném věku jsou málo známé. Klinické projevy se objevují se zpožděním a rizikové faktory, příčiny, prognóza a možnosti akutní léčby po ischemii u novorozenců a dětí se značně liší v porovnání s dospělými pacienty. Nejčastějšími projevy mohou být fokální nebo generalizované záchvaty, poruchy vědomí a paměti apod. (*Kotila & Waltimo, 1992; Ganesan et al., 2000*). V raném, podobně jako ve starším věku, může vést mozková ischemie k smrti, edému mozku, kognitivním poruchám, epilepsiím¹ a dalším komplikacím.

2 Ischemie

Ischemie je stav, při kterém dochází k dočasnému nebo úplnému zastavení přívodu krve do určité tkáně, což způsobuje hypoxii, narušení iontové homeostázy, energetické stability a poškození až nekrózu postižené oblasti. Ireversibilní mozková poškození se objevují při poklesu krevního průtoku pod 10 ml/100 g/min, pokud je průtok úplně přerušen, poškození se objevuje již během několika minut.

Existuje několik druhů ischemie, které se liší dle způsobu vzniku nebo dle tkání či orgánů, které postihuje. Ischemie vzniká na základě přerušení krevního průtoku cévami, konkrétně jejich prasknutím nebo ucpáním. K ucpání cévy může docházet několika způsoby, např. vznikem spazmů (křečová kontrakce cévy), ucpáním krevního řečiště tromby (krevními sraženinami) nebo materiálem přepravovaným krevním řečištěm (embolie).

Ischemie se může objevovat i za normálních fyziologických podmínek např. v menstruačním cyklu. Velmi nebezpečné jsou však její patofyziologické formy, které mohou poškozovat srdce, ledviny, horní i dolní končetiny, střeva či mozek.

Jednou z nejzávažnějších forem ischemie je ischemie cerebrální, která mívá nejen dlouhotrvající neurologické, ale často i fatální následky. Při cerebrální ischemii je tok krve částečně nebo úplně blokován (*Hossmann, 1999*) a dochází tedy k nedostatečnému krevnímu zásobení určité oblasti mozku. V klinických studiích i animálních modelech, bylo zjištěno, že

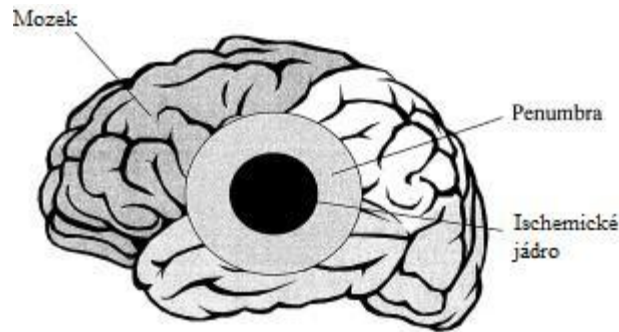
¹ Chronické neurologické onemocnění projevující se opakovanými spontánními epileptickými záchvaty

ve všech formách cerebrální ischemie je zasažen hipokampus, který je velmi citlivý na nedostatek kyslíku (*dle rev. Driscoll et al., 2008*).

Ischemie se dělí na akutní a chronickou nebo globální a fokální ischemii (*Siesjö et al., 1990; Siesjö, 1992; Siesjö et al., 1995*). Akutní či chronická forma cerebrální ischemie se určuje dle doby, po níž přetrvává snížený krevní průtok a dalším faktorem je rozsah/výskyt oblastí se sníženým průtokem. Globální cerebrální ischemie postihuje většinou celý mozek a je způsobena převážně zástavou srdce nebo přerušením hlavních cerebrálních arterií a tedy přívodu kyslíku a glukózy do celého mozku. Při globální ischemii dochází k opožděné buněčné smrti, kdy během několika hodin až dní po ischemii odumírají neurony (*Buchan & Pulsinelli, 1990*). Zatímco fokální ischemie vede ke snížení krevního průtoku a s ní spojené neurodegeneraci pouze ve vymezených oblastech.

2.1 Důsledky ischemie

Ischemický stav vážně narušuje fyziologické procesy především kvůli nedostatečnému přívodu glukózy, kyslíku a vysokoenergetických fosfátů do tkáně. Při fokální ischemii vznikají dvě struktury: *jádro ischemie* a *penumbra* neboli ischemický polostín (viz obrázek č. 1). V ischemickém jádře dochází ke snížení krevního toku o 85 a více procent, zatímco v okolní penumbře klesá krevní tok na méně než 40 %. V jádře v důsledku nedostatku kyslíku dochází k masivní neuronální smrti. Oproti tomu penumbra nepodléhá tak dramatickým událostem jako jádro ischemie a neurony mohou částečně čerpat kyslík z okolních cév a zachovávat svou funkci. Nicméně i v penumbře může docházet k infarktu či šířící se depresi, produkci volných radikálů, postischemickému zánětu a následné apoptóze izolovaných neuronů.

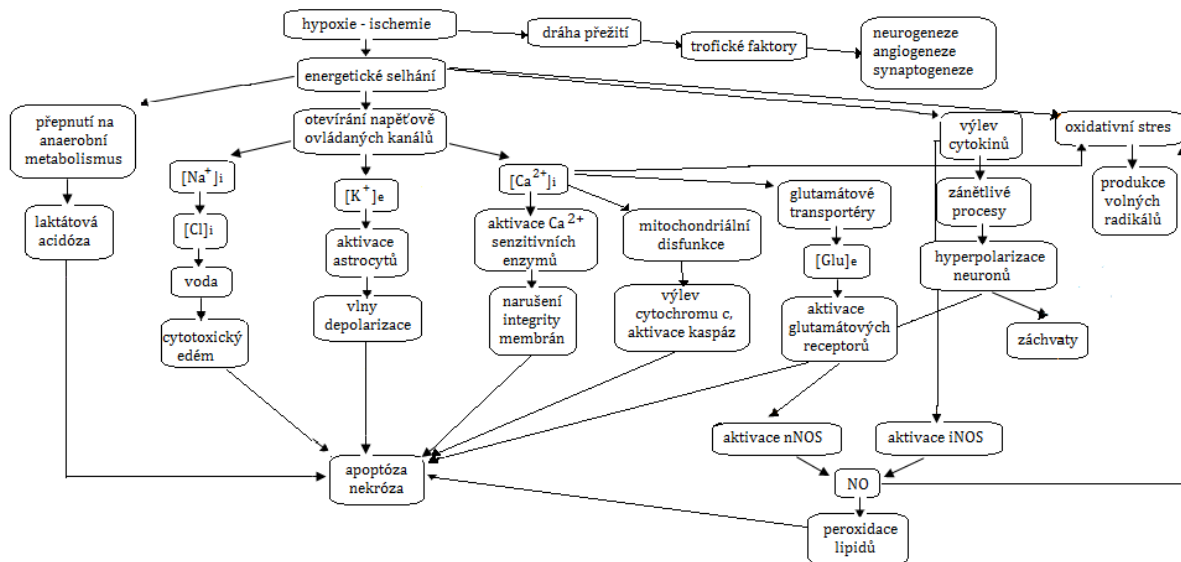


Obrázek 1. Schéma vznikajících struktur při ischemické cévní mozkové příhodě. Ischemické jádro jako oblast vysoké úmrtnosti neuronů. Penumbra, zóna s potenciálně životaschopnými neurony (upraveno podle Hutchison *et al.*, 2004).

Ischemický stav v důsledku nedostatečného přísunu energetických substrátů vede k poškození membránových iontových pump, což způsobuje narušení membránového potenciálu a otok buněk (výlev draslíku a naopak vstup sodíku, chloridu a vody do buněk; viz obrázek č. 2). Dochází tak k membránové depolarizaci, změnám pH, synaptickým remodelacím (Jourdain *et al.*, 2002) a v neposlední řadě k hromadění různých metabolitů, zejména laktátu (vedoucímu k acidóze), glutamátu (u kterého jsou známy excitotoxické účinky: Astrup *et al.*, 1981; Choi & Rothman, 1990), dopaminu, GABA a taurinu. Nárůst extracelulární koncentrace glutamátu na toxickou úroveň (Bullock *et al.*, 1995) vede k periinfarktové depolarizaci, produkci kyslíkových radikálů, zánětu nebo buněčné smrti (Dirnagl *et al.*, 1999). Na ischemické poškození odpovídají i gliové buňky: např. astrocyty reagují otokem a agregací vytváří gliální jizvu, zvyšují glutamátový „uptake“² a čerpají draslík zpět do buňky (Anderson *et al.*, 2003). Aktivují se i mikroglie, které vytvářejí cytokiny jako imunitní odpověď na patologický stav (Gregersen *et al.*, 2000).

Zatímco aspekty ischemie a související následky jsou relativně dobře popsány u dospělých pacientů a zvířat, nezralý mozek bývá v těchto souvislostech téměř neprozkoumán a celá řada mechanismů může být odlišná vzhledem k probíhajícím vývojovým změnám.

² zpětné vychytávání látky



Obrázek 2. Schéma patofyziologických procesů způsobených ischemií (upraveno podle Giza & Hovda, 2001; Yenari & Han, 2012).

2.2 Vliv ischemie na metabolismus mozku

2.2.1 Energetický metabolismus

Přestože mozek zaujímá pouze 2 % tělesné hmotnosti, spotřebovává značnou část energie z celkového energetického obrátu (až 20 %), přičemž převážná část je využívána k ustálení elektrochemických potenciálů. Glukóza je do mozku transportována krevním řečištěm přes hematoencefalickou bariéru a její přítomnost okamžitě zahajuje oxidativní metabolismus. V mozku nejsou žádné rezervní zásoby kyslíku oproti např. myoglobinu ve svalech, proto je velmi citlivý k jeho nedostatečnému přísunu. Kyslík je v mozku spotřebován převážně neurony (75 %) a využit na oxidaci cukrů, která poskytuje většinu nezbytné energie pro fyziologickou aktivitu. Zvýšená buněčná aktivita spojená s mozkovou funkcí vyžaduje zvýšení přísunu glukózy, produkci ATP a zvýšení krevního průtoku.

Ačkoli je glukóza esenciálním energetickým substrátem živých tkání, experimentální studie ukazují, že v mozku by preferenčním substrátem pro tvorbu energie mohl být laktát (Wyss *et al.*, 2011) a výsledným produktem aerobního metabolismu není pyruvát, ale právě

laktát (*Schurr & Gozal, 2012*). Gliové buňky jsou zodpovědné za přeměnu glukózy na laktát a mj. za přenos laktátu k neuronům.

Kromě toho má laktát přímé neuroprotektivní účinky při hypoglykemii či cerebrální ischemii, kdy jeho podání po ischemii zabraňuje neurodegeneraci a zmenšuje poškozenou oblast (*Berthet et al., 2009; Horn & Klein, 2013*), chrání proti excitotoxicitě glutamátu (*Ros et al., 2001*) a oxidativnímu stresu (*Schurr & Gozal, 2012*) a zdá se mít důležitou roli ve vyvíjejícím se mozku (hlavně v prenatálním a raném postnatálním stádiu), kdy je jeho hladina v krvi (*McMichael et al., 2005*) a mozkové tkáni (*Cady et al., 1996*) zvýšena.

Během fokální ischemie dochází ke zvýšení hladiny energetických metabolitů, např. laktátu, inosinu, hypoxantinu a adenosinu v extracelulární tekutině (*Hillered et al., 1989*). Zvýšená koncentrace laktátu, inosinu, hypoxantinu a adenosinu zřejmě koreluje s intracelulární akumulací těchto metabolitů a může být indikátorem metabolické dysfunkce. Zvýšený poměr laktát/pyruvát odráží přeměnu pyruvátu na laktát během anaerobních podmínek a je indikátorem redoxních změn probíhajících při ischemii. Tyto změny jsou během globální ischemie mnohem rychlejší a kvantitativně výraznější. Adenosin je znám svými vazodilatačními účinky, proto jeho zvýšená hladina zlepšuje regionální krevní průtok v penumbře, čímž zabraňuje degeneraci neuronů (*Rudolphi et al., 1992*).

2.2.2 Aminokyseliny a jejich produkty

Výsledky studií provedených na animálních modelech cerebrální ischemie (*Andiné et al., 1991b; Bogaert et al., 2000; van Hemelrijck et al., 2005b*) jednoznačně prokázaly zvýšenou hladinu excitačních aminokyselin (AK), glutamátu, aspartátu i hormonu dopaminu, která přetrvává několik hodin. Obdobné nálezy byly zjištěny u lidských pacientů po mozkové příhodě (*Meyerson et al., 1990; Bullock et al., 1995*), u kterých zvýšená hladina zmíněných AK přetrvávala i několik dnů. Za normálních fyziologických podmínek je glutamát po výlevu vychytáván astrocyty (*Rothstein et al., 1996*), kde je přeměněn na glutamin a následně transportován zpět do neuronů, kde je opětovně konvertován na glutamát. Při patofyziologických stavech, zvýšená koncentrace glutamátu a aspartátu přispívá k neurodegeneraci zřejmě zvýšením intracelulárního Ca^{2+} a zvýšená hladina dopaminu autooxidací způsobuje vznik volných kyslíkových radikálů během reperfuze (*Callaway et al.,*

2003). Při zvýšení hladiny extracelulárního glutamátu, zapříčiněné zvýšeným výlevem glutamátu do synaptické štěrbiny, dochází k tzv. excitotoxicitě. Tento patologický stav následně vede ke zvýšení intracelulárního vápníku a poškození neuronálních buněk. Řada studií obhájí hypotézu, že glutamátové receptory vyvolávající excitotoxicitu, hrají důležitou roli v buněčné smrti a jsou více kritické ve vyvíjejícím se mozku než v dospělém (*Barks & Silverstein, 1992*). Glutamátergní excitotoxicita se objevuje v celé řadě neurodegenerativních onemocnění, např. u Alzheimerovy nemoci, amyotrofické laterální sklerózy, autismu, cévní mozkové příhody a je součástí ischemické kaskády.

Ischemií indukované zvýšení koncentrace excitačních AK je u dospělého mozku vyšší v porovnání s vyvíjejícím se mozkiem (*Oja & Saransaari, 2013*). Během ischemie dochází rovněž ke zvýšení extracelulární koncentrace inhibičních AK, především GABA, glycinu a taurinu. Bylo dokázáno, že inhibiční aminokyseliny působí neuroprotektivně v oblasti penumbry (*Hutchinson et al., 2002*). Zvýšený výlev GABA je zapříčiněn zvýšenou syntézou z glutamátu během ischemie/reperfuze a sníženou degradací během anaerobních podmínek (*Erecińska et al., 1984*). V hipokampu a kůře má GABA v časném stádiu vývoje primárně excitační účinky (*Ben-Ari, 2002*) a ze synaptické štěrbiny je vychytávána převážně neurony, na rozdíl od glutamátu, který je vychytáván astrocyty.

Vzestup hladiny taurinu v hipokampu dospělého potkana je indukován procesy poškozující buňky, např. excitotoxickou koncentrací glutamátu, hypoxií, hypoglykemií, ischemií, metabolickými jedy nebo kyslíkovými radikály. Jsou publikované studie, které ukazují, že extracelulární taurin má i neuroprotektivní účinky, a že jeho vylučování z excitovaných neuronů snižuje vtok vápníku do cytosolu přes transmembránové iontové transportéry a intracelulární zásobníky (*Foos & Wu, 2002*).

Studie na dospělých laboratorních potkanech prokázaly, že během ischemické příhody se také zvyšuje poměr citrulin/arginin (*van Hemelrijck et al., 2005b*), který koreluje s mírou aktivity syntáz oxidu dusnatého (NOS) a vzniku oxidu dusnatého (*Kader et al., 1993*). Oxidací argininu v ornitinovém cyklu vzniká citrulin spolu s oxidem dusnatým (NO). Oxid dusnatý se v CNS účastní vazodilatace, excitotoxicity a dlouhodobé potenciace, tj. LTP („long-term potentiation“). Během ischemie může způsobit buněčnou smrt, naproti tomu může působit i neuroprotektivně, protože inhibuje adhezi buněk a aktivuje krevní destičky a neutrofile.

Experimentální studie na modelech fokální i globální ischemie u dospělých zvířat prokázaly nárůst koncentrací dalších AK, např. alaninu, tyrosinu (*Hillered et al., 1989*) či histidinu, prekursoru histaminu, u kterého jsou rovněž známy neuroprotektivní účinky (*Fang et al., 2014*).

Metabolické změny související s cerebrální ischemií jsou dobře popsány jak u dospělých pacientů, tak i v řadě experimentálních studií na dospělých laboratorních zvířatech. Nicméně v nezralém mozku, kde probíhá řada věkově vázaných strukturálních změn, jsou aspekty vlivu ischemie na metabolické změny nedostatečně probádány. Klinické studie ovšem nedovolují detailní analýzu mechanismů a odlišení efektů ischemií indukovaných lokálních metabolických změn, poruch neurotransmise a efektů jiných patologických stavů, např. kardiovaskulárních onemocnění nebo změn systémových parametrů (tělesné teploty nebo krevního tlaku). Oproti tomu využití experimentálních modelů cerebrální ischemie přináší celou řadu výhod: studovaná populace může být více homogenní z hlediska individuální historie, genetického pozadí, věku, etiologie, závažnosti inzultu, sledování a vyhodnocování výsledků. V neposlední řadě příslušné animální modely umožňují studium časové korelace mezi lokální perfuzí, hypoxií a dalšími systémovými parametry, kterými jsou metabolické změny či ischemií indukované záchvaty (jejich závažnost a semiologie).

3 Modely

3.1 Modelová zvířata

K modelovým zvířatům používajících se v neurologických experimentech patří kromě primátů a jiných savců nejčastěji hlodavci. Využívá se jejich snadného odchovu, obecné rezistence k řadě onemocnění, krátké gestační době (22,5 dne) a dobré znalosti neurofyzologie a makro- i mikroneuroanatomie. Používají se myši, morčata, fretky či křečci, avšak pro svou strukturální a funkční neuroanatomickou podobnost lidskému mozku bývají nejčastějšími a nejdostupnějšími modelovými zvířaty laboratorní potkani. Všechny tyto druhy se rodí ve stádiu s nedokončeným vývojem a některé neurogenní události probíhají postnatálně.

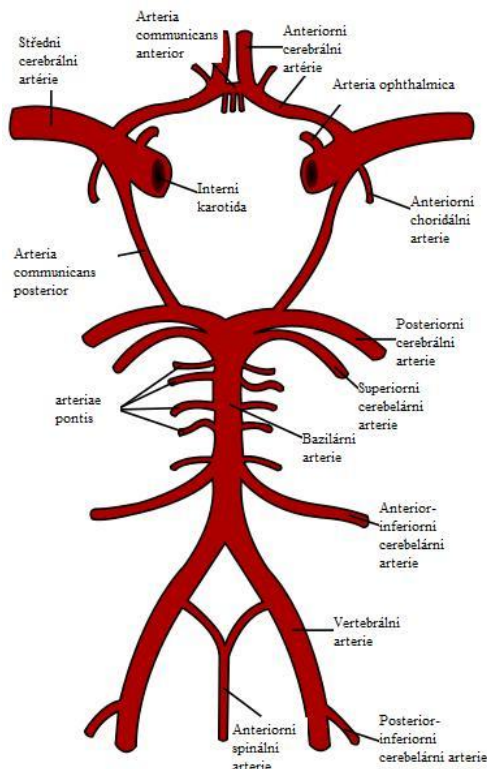
3.1.1 Rozdíly mezi dospělým a nezralým mozkem u laboratorního potkana

Ze srovnávacích studií zabývajících se porovnáváním vývoje neokortexu u mláďat potkanů a novorozeňat vyplývá, že 1. až 10. postnatální den u laboratorního potkana odpovídá třetímu trimestru těhotenství u lidí. Bylo zjištěno, že vývojové stádium mozku mláďete potkana starého 10. – 11. dní (z hlediska morfologického a biochemického) odpovídá vývojovému stádiu mozku novorozeněte (*Dobbing, 1970; Dobbing & Sands, 1979*) a 12. - 13. denní mláďe potkana vykazuje podobné jevy na elektrokortikogramu jako novorozené dítě (*Romijn et al., 1991*).

Oproti dospělým vykazují 10. - 13. denní zvířata určité odlišnosti. Nezralý hipokampus je stejně jako okolní mozek plastický, maturace mediátorových systémů a myelinizace není dokončena (*Cuzner & Davison, 1968*) a odpovědi CNS na stres jsou odlišné v porovnání s dospělým mozkem. Zároveň v tomto období probíhá strukturální a funkční maturace mozku a představuje kritické období pro vznik nezvratných neuropatologických poškození zvláště proto, že v 2. postnatálním týdnu vrcholí proces synaptogeneze (*Steward & Falk, 1991*). Odlišnosti mezi nezralým a dospělým mozkem jsou i v cévním zásobení mozku.

3.1.2 Cévní zásobení mozku potkana

Hlavními cévami přivádějícími kyslík a živiny do dospělého mozku jsou dva páry tepen, karotid, *arteria carotis interna dextra et sinistra*, a páteřních tepen, *arteria vertebralis dextra et sinistra*. Vertebrální arterie se spojují v *a. basilaris*, která spolu s karotidami vytváří tzv. Willisův okruh (obrázek č. 3). Ten zajišťuje správné zásobení mozku i v případě, že by jedna z hlavních cév byla ucpana. Mláďata obecně mají velmi dobré krevní zásobení mozku, zřejmě i díky často se vyskytujícím vaskulárním anastomózám. Tyto anastomózy představují funkční propojení mezi cévami, čímž vzniká alternativní cesta pro proudění krve v orgánu či tkáni. Konkrétně u hipokampu z morfometrického měření vyplývá, že v druhém postnatálním týdnu (zejména 10. postnatální den) dochází k největšímu nárůstu vaskularizace v této oblasti (*Al-Jaberey et al., 2006*). A můžeme se domnívat, že i proto je nezralý hipokampus velmi náchylný na hypoxicko-ischemický infarkt, pokud bude zablokována větší céva (např. *arteria hippocampi transversae*).



Obrázek 3. Willisův okruh mozkových cév (upraveno podle wikipedia.com).

3.2 Modely ischemie

Mozkovou ischemii a její důsledky můžeme studovat pomocí dvou experimentálních přístupů a to jak v *in vivo*, tak *in vitro* podmínkách (dle rev. Schaller, 2006). *In vitro* modely používají buněčné a tkáňové kultury či mozkové řezy. Tyto modely lze použít na analýzu mechanismů raných změn. Ovšem jejich nevýhodou je, že výsledky studií lze velmi obtížně převést na živé organismy. Na druhou stranu využití *in vivo* modelů na zvířatech (nejčastěji hlodavcích) umožňuje studovat mechanismy vzniku ischemického ohniska a to i v případě diskrétních mozkových oblastí. Mimo jiné v těchto modelech se dají studovat krátko- i dlouhodobé důsledky ischemického poškození a dlouhodobě sledovat dynamiku morfologických i funkčních změn. V současné době jsou animální modely ischemické cévní příhody předmětem ostré kritiky zejména proto, že se nepodařilo ve většině případů potvrdit experimentální výsledky v klinických studiích. Nicméně *in vivo* modely CMP nadále představují zásadní zdroj informací o patofyziologii mozkové ischemie a umožňují testování různých neuroprotektivních látek v kontrolovaných podmínkách (viz tabulka č. 1).

Tabulka 1. Modely cerebrální ischemie (upraveno dle Ginsberg & Busto, 1989; Hunter et al., 1995; McAuley, 1995).

Model	Princip	Pozitiva	Negativa
Okluze střední cerebrální arterie (MCAO): trvalá	okluze distálního a proximálního konce střední cerebrální artérie	výběr umístění okluze umožňuje do jisté míry výběr postižené oblasti mozku	průnik látek do infarktové oblasti je omezen
			variabilita ve velikosti poškozené oblasti
Okluze střední cerebrální arterie: přechodná		pravděpodobně nejrozšířenější experimentální model cévní mozkové příhody	variabilita ve velikosti poškozené oblasti
		možnost posoudit reperfuze poškození po rekanalizaci	
		možnost průniku látek do dané oblasti	
CMP u spontánně hypertenzních potkanů (SHR)	okluze střední cerebrální arterie u hypertenzních potkanů (SHR)	velké korové poškození užitečné v kontrolovaných experimentech	cerebrální cévy jsou odlišné od normotenzních kmenů
			vliv dietních faktorů na rozvoj mozkové příhody u CMP náchylných SHR potkanů
Embolický model	injekce trombinu, makro- x mikročástic	reprodukovatelný model lidské kardioembolické mozkové příhody	variabilita v lokalizaci, distribuci a ve velikosti poškozených oblastí
		možnost studia trombolytických terapií	multifokální model CMP
			možnost spontánní trombolýzy
Fototrombotický model	intravenózní aplikace fotosenzitivního barviva, následné osvětlení	možnost přesné lokalizace a velikosti infarktové oblasti kortexu	v některých aspektech se liší od lidské CMP, např. žádná penumbra
		možnost kontroly velikosti infarktové oblasti - intenzita záření	
		invazivita procedury minimální	
		možnost studia antiagregačních a trombolytických terapií	

Endotelinový model	injekce vazokonstrikční látky	reprodukovatelný model lidské CMP	
		možnost kontroly velikosti infarktové oblasti - koncentrace ET-1	

Obvyklými animálními modely fokální ischemie bývají trvalé nebo dočasné okluze hlavních cerebrálních arterií, např. střední cerebrální arterie (*Hunter, 1977; McAuley, 1995*). Okluze se provádí na distálním a proximálním konci arterie a vyvolává infarktaci mnoha struktur v dané hemisféře, zejména striata a přilehlého kortexu. V některých případech se kombinuje s ipsilaterální okluzí *arteria carotis comunis*. V tomto případě je ischemie rozšířena na oblast frontálního, parietálního a temporálního laloku.

Dalším modelem fokální cerebrální ischemie jsou tromboembolické modely, při kterých bývají zvířatům injikovány makro- či mikročástice nejčastěji do *arteria carotis interna*. Částice, např. polyethylenové kuličky, trombin aj., poté způsobí ucpání cévy a vyvolají rozsáhlou infarktaci mozkové tkáně (*Zhang et al., 1997*).

V současné době jsou popsány modely fokální ischemie, u kterých je míra ischemie víceméně kontrolována. Prvním modelem je *fototrombotická léze*, která je vyvolána pomocí intravenózních aplikací fotosenzitivního barviva a následným transkraniálním osvětlením krátkými pulzy koherentního světla (obvykle zelený laserový paprsek). Osvícení indukuje agregaci trombocytů a zablokování krevního průtoku cévami (*Watson et al., 1985; Labat-gest & Tomasi, 2013*). Jednou z nevýhod fototrombotického modelu je nepřítomnost penumbry, tudíž studium některých patofyziologických mechanismů spojených s ischemií není možné.

Druhý model, který se využívá pro vyvolání kontrolované ischemie, je *model endotelinový*. Tento model spočívá v injekci silné vazokonstrikční látky, kterou je endotelin-1, do mozku, kde vyvolá rychlý pokles krevního průtoku a následnou ischemii (*Agnati et al., 1991; Sharkey et al., 1993*). Endotelinový model je považován za vysoce reprodukovatelný model lidské cévní mozkové příhody (*Gilmour et al., 2004*). Oproti fototrombotickému modelu lze při využití endotelinem vyvolané ischemie studovat celou řadu mechanismů a to

jak v ischemickém jádře, tak i v oblasti penumbry. Nicméně je nutné zdůraznit, že endotelin (navzdory jeho fyziologickému původu) je nepropustný přes hematoencefalickou bariéru.

Nespornou výhodou obou těchto modelů je možnost kontroly rozsahu poškození, v prvním modelu intenzitou záření, v druhém modelu koncentrací/dávkou vazokonstrikční látky. Proto jsou v současné době tyto dva modely hojně používány pro studium mechanismů vzniku a důsledků fokální cerebrální ischemie *in vivo*.

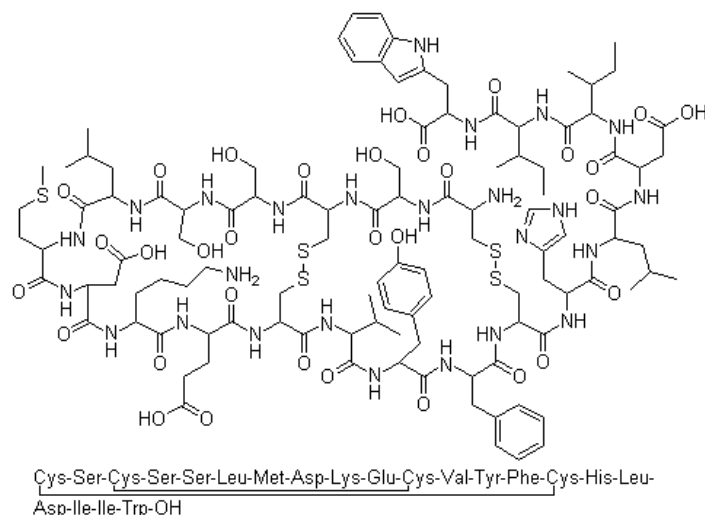
4 Endoteliny

Endoteliny jsou rodina silných endogenních vazoaktivních peptidů. Z biochemického hlediska se jedná o 21 aminokyselinové peptidy (Yanagisawa *et al.*, 1988). Charakteristická struktura endotelinů připomíná strukturu sarafotoxinů, kardiotoxických polypeptidů, které se nacházejí v jedu izraelské kobry.

4.1 Izoformy endotelinů

Do rodiny endotelinů patří tři izoformy, ET-1, ET-2 a ET-3. Každý je kódován jiným genem a vzájemně se liší expresí v různých orgánech, silou vazokonstrikce (ET-1 > ET-2 >>> ET-3) a vazbou na endotelinové receptory (Arai *et al.*, 1990; Roubert *et al.*, 1991).

ET-1 je nejvýznamnější vazokonstrikční peptid (viz obrázek č. 4), který je nejvíce zastoupený v kardiovaskulárním systému, kde je neustále produkován k regulaci vaskulárního tonu (Haynes & Webb, 1994). Primárně je vylučován endotelovými buňkami, dále vaskulárními buňkami hladkých svalů, makrofágy, leukocyty, kardiomyocyty a fibroblasty hlavně v mozku a ledvinách.



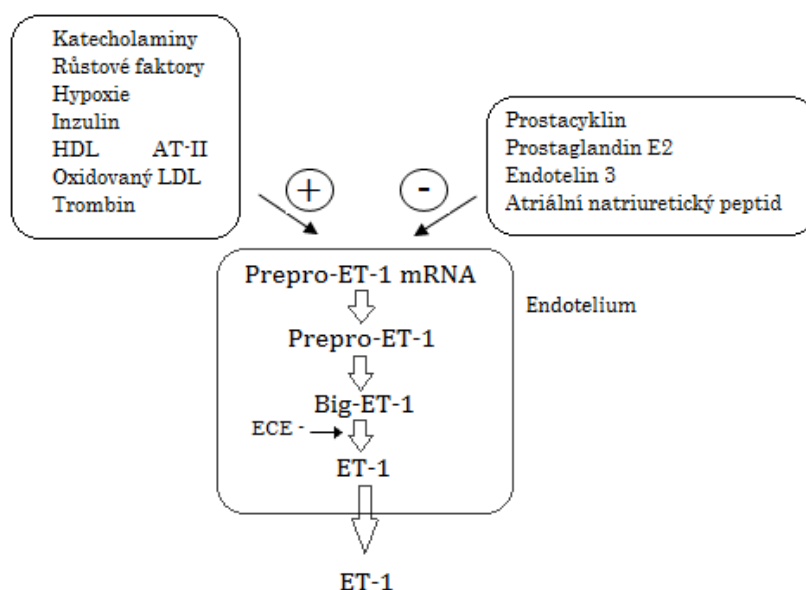
Obrázek 4. Struktura endotelinu-1 (zdroj chemblink.com).

Následně byly popsány izoformy ET-2 a ET-3, které jsou exprimovány v různých orgánech. Endotelin-2 se od ET-1 liší pouze ve 2 aminokyselinových zbytcích, k receptorům (ET_A a ET_B) je vázán se stejnou afinitou a má stejné vazokonstrikční účinky jako ET-1. Je tvořen především ve střevech, plicích, srdci, ledvinách, nadledvinkách a vaječnících, kde hraje důležitou roli v ovulačním cyklu, kde vyvolává vazokonstrikci vedoucí k ovulaci (*Ko et al., 2006*). Na druhé straně svou roli sehrává i při srdečním selhání, imunologických procesech a rakovině.

ET-3 se v mozku potkana vyskytuje v nejvyšší koncentraci ze všech izoform endotelinů (*Matsumoto et al., 1989*) a to především v neostriatu, hypotalamických jádrech, hipokampu, purkyňových buňkách mozečku a prodloužené míchy (*Giaid et al., 1991*). Dále je přítomen v ledvinách, plicích, trávicím systému, hypofýze (*Matsumoto et al., 1989*) a ve vysokých koncentracích v krvi. Tato izoforma má stejnou afinitu k ET_B receptorům jako ET-1 a ET-2, oproti tomu k ET_A receptorům je na rozdíl od ostatních izoform vázán s velmi nízkou afinitou.

4.2 Syntéza endotelinů

Syntéza endotelinů (viz obrázek č. 5) primárně probíhá v endoteliálních buňkách proteolytickým štěpením polypeptidického prekursoru prepro-endotelinu (velkého cca 200 AK) neuronální endopeptidázou, furinem. Následně vznikne tzv. „big endotelin“, který je konvertován a hydrolyzován na biologicky aktivní endotelin pomocí „*endotelin converting*“ enzymu (ECE-1 a ECE-2). ECE-1 je vysoce specifická metaloproteáza, exprimovaná na plazmatické membráně, intracelulárně v Golgiho aparátu, vezikulech endoteliálních buněk (Schweizer *et al.*, 1997) nebo ve vaskulárních hladkých svalových buňkách (Barnes & Turner, 1999). Během syntézy je ET-1 transportován sekrečními vaky k plazmatické membráně, odkud se může vázat ke svým receptorům.



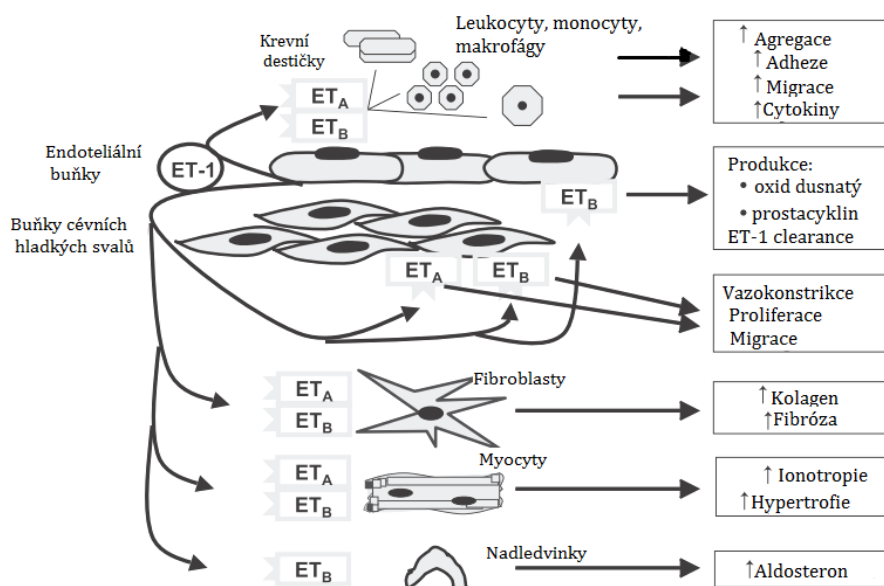
Obrázek 5. Schéma syntézy ET-1 a její regulace (upraveno podle Vázquez-Rey & Kaski, 2003).

AT-II - angiotenzin II, **HDL** - vysokodenzitní lipoprotein, **LDL** - nízkodenzitní lipoprotein, **ECE** - tzv. „endotelin converting“ enzym

4.3 Role endotelinů

Endoteliny se vyskytují a ovlivňují mnoho typů tkání a systémů, mj. např. somatosenzorický, zrakový, trávicí, cirkulační, respirační, imunitní, endokrinní, urogenitální, reprodukční, renální, periferní nebo centrální nervový systém. Účinky na vybrané orgánové soustavy jsou popsány v tabulce č. 2 a na obrázku č. 6. Pro své mitotické a proliferativní účinky mají roli ve vývoji (Baynash *et al.*, 1994) a ovlivňují vývoj buněk neurální lišty a sympatických neuronů (Kedzierski & Yanagisawa, 2001).

Endoteliny působí v malých koncentracích vazodilatačně, ve vysokých koncentracích vazokonstrikčně a jejich parakrinní působení způsobuje sekreci vazoaktivních faktorů, které ovlivňují krevní průtok (Hochoer *et al.*, 1997; Biernaskie *et al.*, 2001). V mozku působí jako neuropeptidy, ovlivňují neurotransmisi, neurální excitabilitu, komunikaci v CNS (Yoshizawa *et al.*, 1990) nebo přenos bolestivých podnětů (Khodorova *et al.*, 2009). Dále ovlivňují kardiorespirační centra, výlev hormonů nebo homeostázu krevního tlaku (Mosqueda-Garcia *et al.*, 1993). Některé studie dokonce přisuzují endotelinu-1 roli neurotransmiteru na základě objevu váčků v perivaskulárních nervech (Loesch *et al.*, 1998).



Obrázek 6. Schéma působení endotelinu-1 u různých typů buněk (upraveno podle Galie *et al.*, 2004).

ET-1 - endotelin-1, ET_A - endotelinový receptor typu A, ET_B - endotelinový receptor typu B.

Jelikož jsou endoteliny zastoupeny v mnoha fyziologických systémech a procesech, není překvapující, že jsou příčinou i mnoha patologických stavů. Ve zvýšených koncentracích byly zjištěny při různých onemocnění, kterými jsou např. těhotenská, plicní, portopulmonární nebo systémová hypertenze (Feldstein & Romero, 2007), ateroskleróza (Verghese et al., 1996), infarkt myokardu (Moe et al., 2003; Ohkita et al., 2012), diabetes (Kalani, 2008) či akutní nebo chronické selhání ledvin (Richter, 2006; Larivière & Lebel, 2003). Svou nezastupitelnou roli hrají i v zánětlivých procesech (Angerio, 2006), fibróze (Sticherling, 2006), ve vzniku glaukomu (Chauhan, 2008), mozkového vazospazmu³ (Clozel & Watanabe, 1993) nebo rakoviny, kde podporují růst nádorových buněk (Shichiri et al., 1991). Vyšší hladina endotelinu-1 se objevuje i v plazmě (Alioğlu et al., 2002) a cerebrospinální tekutině u pacientů s cévní mozkovou příhodou (Barone et al., 1994).

Tabulka 2. Působení endotelinů na jednotlivé orgánové soustavy (upraveno podle Unic et al., 2011).

Orgány a orgánové soustavy	Efekt endotelinu
Játra	Kontrakce jaterních hvězdčovitých buněk
	Vazokonstrikce jaterních cév
	Aktivace glykogenolýzy
	Relaxace buněk
Centrální nervový systém	Vazokonstrikce cerebrálních arterií
Kardiovaskulární systém	Vazokonstrikce koronárních cév
	Pozitivní chronotropní efekt
	Pozitivní ionotropní efekt
Krevní cévy	Přímý vazokonstrikční efekt
Buněčné kultury	Mitogenní efekt
Ledviny	Vazokonstrikce aferentních a eferentních arterií
	Pokles toku renální plazmy
	Snížení glomerulární filtrace
Dýchací systém	Vazokonstrikce plicních a bronchiálních krevních cév
Endokrinní systém	Zvýšení sekrece reninu, aldosteronu a adrenalinu
	Sekrece atriálního natriuretického peptidu

³ dlouhotrvající intenzivní vazokonstrikce velké artérie v subarachnoidálním prostoru

Působení endotelinu-1 a role endotelinových receptorů jsou poměrně dobře popsány u dospělých zvířat, ovšem mechanismy účinku endotelinu a úloha jeho receptorů v nezralém mozku jsou relativně málo prozkoumané. Jedna z mála studií věnovaná expresi prekursoru endotelinu (prepro-ET-1 mRNA) v prenatálním a postnatálním období vývoje zjistila prvotní přítomnost endotelinu-1 okolo 11. embryonálního dne v míše. Objev endotelinu-1 v retikulárním jádře hypotalamu a Varolově mostu indukoval myšlenku, že ET-1 má roli ve vývoji dýchacího systému a kardiorespirační regulaci. Tato myšlenka byla záhy potvrzena, protože exprese endotelinu-1 dramaticky narůstá v období přechodu z fetálního dýchání na postnatální dýchání (*Tsang et al., 2005*).

5 Receptory

Endotelin-1 reaguje převážně se dvěma typy receptorů ET_A a ET_B. Tyto receptory mají 7 α helikální transmembránovou doménu s extracelulární aminoskupinou a intracelulární karboxyskupinou a patří do třídy A-receptorů asociovaných s heterotrimerickými G-proteiny (*Davenport, 2002*). Tyto receptory (ET_A a ET_B) jsou z 50 % identické a vzájemně se liší umístěním, účinky (viz obrázek č. 6. a 7.) a afinitou (*Goto et al., 1996*).

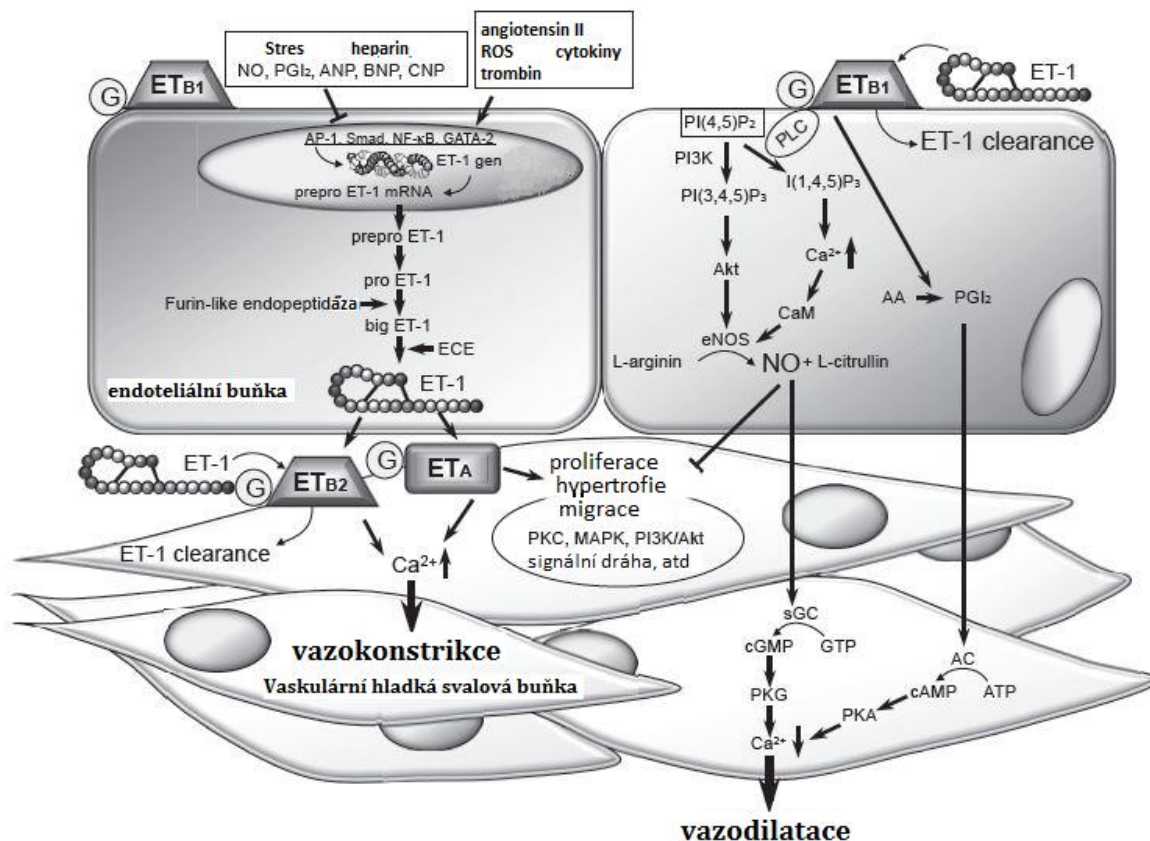
5.1 Typy endotelinových receptorů

ET_A receptory (50-70 kDa) se nacházejí na buňkách hladkých svalů v *tunica media* krevních cév a jsou vysoce specifické pro endotelinovou izoformu ET-1 (*Arai et al., 1990*). Mají mitotické, proliferační a hypertrofické účinky a schopnost vaskulární remodelace. Po navázání agonisty způsobují vazokonstrikci (*Nilsson et al., 1997*) a tím zvyšují krevní tlak (*Yip & Krukoff, 2002*). ET_A receptory jsou odpovědné za vazospazmy (*Clozel & Watanabe, 1993*) po poranění mozku, které mohou způsobovat ischemii a hrají roli v patofyziologii kardiovaskulárních i renálních onemocnění (*Granger, 2003*). Farmakologické ovlivnění těchto receptorů pomocí látek s vazoprotektivním účinkem vede ke zmenšení rozsahu infarktované oblasti a zlepšení krevního průtoku (*Galiuto et al., 2000; Reriani et al., 2010; Bugge & Ytrehus, 1996*).

ET_B receptory (30-40 kDa) jsou distribuované dominantně na astrocytech (*Baba, 1998*), mikroglíích (*McLarnon et al., 1999*), vaskulárních endoteliálních buňkách, renálních epiteliálních, endokrinních a nervových buňkách. Bylo zjištěno, že na oligodendrocytech se tyto receptory nevyskytují (*Rogers et al., 1997*), nicméně ovlivňují jejich vývoj (*Gadea et al., 2009*). V mozku se nacházejí v mozkové kůře (*Fernández-Durango et al., 1994*), hipokampu (*Williams et al., 1991*) a striatu (*Tayag et al., 1996*). Nejsou specifické a reagují se všemi typy endotelinů podobně. ET_B receptory zajišťují přežití endoteliálních buněk, inhibici ECE-1 a tzv. „clearance“⁴ ET-1 z krve a extracelulárního prostoru převážně v plicích, ledvinách a játrech (*Fukuroda et al., 1994*). Tento typ receptorů se vyskytuje i na určité populaci dopaminergních neuronů v potkaním striatu, kde vyvolávají výlev dopaminu (*Webber et al., 1998*). Existují 2 podtypy ET_B receptorů: ET_{B1} a ET_{B2} (viz obrázek č. 7). Po navázání endotelinů na ET_{B1} dochází k syntéze a výlevu oxidu dusnatého a prostacyklinů, které způsobují vazodilataci, nátriurézu⁵, diurézu a snížení krevního tlaku, zatímco vazbou endotelinů na ET_{B2} receptory, nacházejících se na vaskulárních buňkách hladkých svalů, dochází k vazokonstrikci. Účinky těchto receptorů jsou za normálních podmínek zanedbatelné, ovšem zajímavější jsou jejich role při různých onemocnění, např. ateroskleróze či hypertenzi.

⁴ očištění krve od určité látky

⁵ vylučování sodíku močí



Obrázek 7. Schéma syntézy ET-1 a působení endotelinu na ET_A , ET_{B1} a ET_{B2} typy receptorů na vaskulárních endoteliálních a hladkých svalových buňkách (upraveno podle Ohkita *et al.*, 2012).

G - G protein, **AA** - arachidonová kyselina, **ROS** - reaktivní kyslíkové radikály, **CaM** - kalmodulin, **PGI₂** - prostaglandin I₂, **AC** - adenyl cycláza, **sGC** - solubilní guanylyl cykláza.

Je nutné zmínit, že ET_A mohou interagovat s ET_B receptory (Rapoport & Zuccarello, 2011) a inhibiční efekt selektivní blokády jednoho ET receptoru, může být limitována kompenzačními mechanismy neblokovaného receptoru. Jsou i důkazy, že tvoří heterodimery, zřejmě proto, že ET_B potřebuje ET_A receptor k rozpoznání a navázání ET-1 (Harada *et al.*, 2002).

Poměrně kontroverzním tématem je výskyt ET_C receptorů, které jsou stimulovány převážně ET-3. Některé studie tvrdí, že jsou přítomny v retině, zatímco fylogenetické studie tvrdí, že ET_C receptory byly ztraceny během evoluce z genomu placentálů a vačnatců, a proto nejsou pro lidskou fyziologii důležité (Hyndman *et al.*, 2009).

5.2 Mechanizmy signální trasdukcce endotelinových receptorů

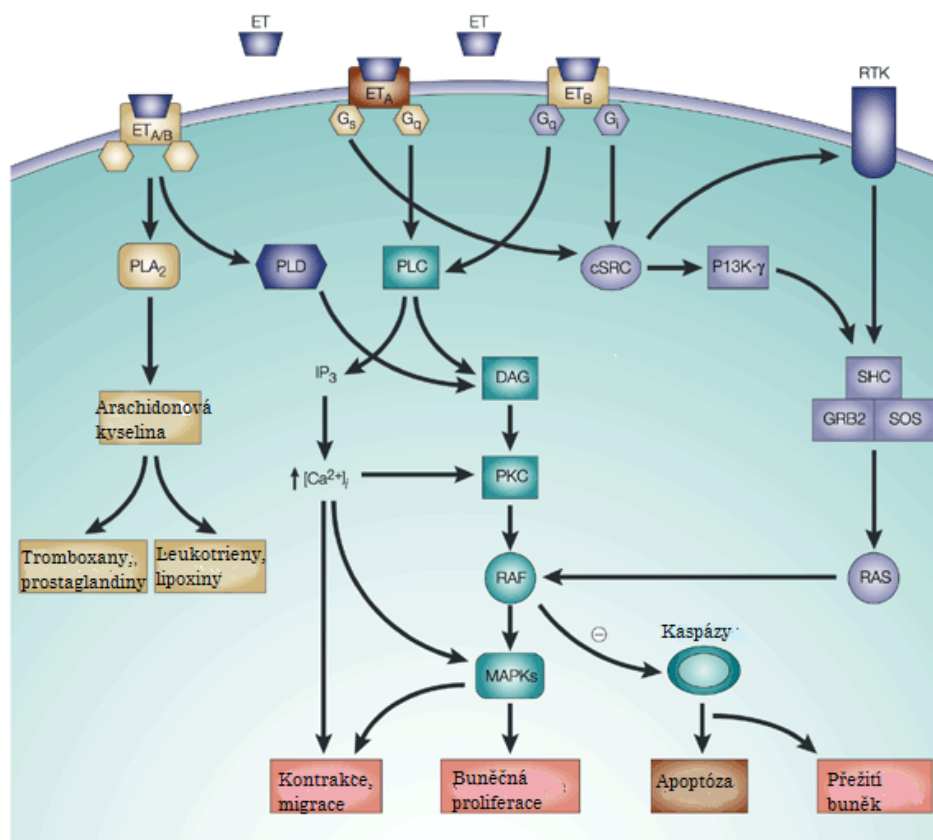
Aktivace endotelinových receptorů ovlivňuje několik buněčných procesů (viz obrázek č. 8), např. vazomotoriku, migraci a proliferaci buněk či signalizaci do jádra, která způsobuje dlouhodobé účinky. Endotelinové receptory mají roli kromě jiného i v metabolismu arachidonové kyseliny, jejíž přeměnou vznikají signální molekuly eikosanoidy (prostaglandiny, prostacykliny, tromboxany, leukotrieny a lipoxiny).

Navázání ET-1 na ET_A receptory, jak je znázorněno na obrázku č. 7. a 8., způsobuje silnou a trvající vazokonstrikci a buněčnou diferenciaci. Aktivace ET_A zřejmě vede k stimulaci fosfolipázy C (PLC) a následně ke vzniku 1,4,5-inositol-fosfátu (IP₃) a membránově vázaného diacylglycerolu (DAG). DAG aktivuje proteinkinázu C (PKC) spojenou s MAPK kaskádou vedoucí k proliferaci a migraci buněk. IP₃ má za následek výlev Ca²⁺ z jeho intracelulárních zásobáren, což způsobí fosforylaci myozinových řetězců a následnou konstrikci (*Simonson & Dunn, 1990*).

ET-1 způsobuje nejen vazodilataci prostřednictvím ET_{B1} receptorů lokalizovaných na endoteliálních buňkách (viz obrázek č. 7.) pomocí aktivace NO syntáz, nárůstu cGMP (*Hirata et al., 1993*) a syntézy prostacyklinů, ale i vazokonstrikci navázáním na ET_{B2} receptory na hladkých vaskulárních svalech (*Stenman et al., 2002*). Intracelulární efekt aktivace ET_B receptorů je stejný jako u ET_A receptorů, počínaje stimulací PLC, vzniku IP₃ a DAG, výlevu Ca²⁺ z intracelulárních zásobníků po aktivaci neselektivních a L-typu vápenatých kanálů. ET_B receptory jsou však propojeny s inhibičními G proteiny, které snižují tvorbu cAMP a aktivaci Na⁺/H⁺ výměníku (*Koh et al., 1990*).

5.3 Regulace syntézy endotelinů a exprese endotelinových receptorů

Produkce a následný výlev ET-1 je zapříčiněn několika fyzikálními či chemickými faktory, např. trombinem, angiotensinem II, cytokiny, hypoxií nebo trvajícím stresem (viz obrázek č. 5 a č. 7). Produkce ET-1 je snižována ženským hormonem estradiolem (*Webb et al., 2000*), což má za následek sníženou incidenci kardiovaskulárních onemocnění spojených s ischemií u mladých žen a žen středního věku před menopauzou.



Obrázek 8. Signalizační dráhy po navázání ET-1 na ET receptory (upraveno podle Remuzzi *et al.*, 2002).

PLA- fosfolipáza A, **PLD**- fosfolipáza D, **PLC** - fosfolipáza C, **DAG** - diacylglycerol, **PKC** - protein kináza C, **RAF** - Raf protein, **MAPK** - mitogenem aktivovaná protein kináza, **RTK** - tyrosin kinázový receptor, **cSRC** - cytosolická tyrosin kináza, **PI3K** - fosfatidyl inositol-3-fosfát kináza, **SHC** - „Src homology domain containing protein“, **GRB2** - vazebný protein pro receptor růstového faktoru 2, **SOS** – „son of sevenless protein“, **RAS** - Ras protein.

Regulace exprese endotelinových receptorů většinou koreluje s expresí samotného endotelinu. Cerebrální ischemie zvyšuje produkci ET-1 a ET_A receptorů v ischemickém jádře na buňkách hladkých svalů cév a ET_B receptorů na endoteliálních buňkách, astrocytech, mikroglíích a makrofázích (Rogers *et al.*, 1997; Loo *et al.*, 2002).

5.4 Role endotelinu-1 při cévní mozkové příhodě

Celá řada experimentálních studií ukazuje, že endotelin-1 hraje významnou roli v procesech, které vedou k poškození mozku během fokální ischemie. Leonova a kolektiv (Leonova *et al.*, 2001) prokázali, že ET-1 snižuje „uptake“ glutamátu v kulturách astrocytů, což vede k excitotoxicitě, ovlivňuje funkce astrocytů a blokuje komunikaci přes tzv. „gap junctions“⁶ mezi astrocyty (Blomstrand *et al.*, 1999; Perez Velazquez *et al.*, 2006). Během ischemie rovněž dochází ke zvýšení syntézy endotelinu-1 v astrocytech, mikroglíích, makrofázích, neuronálních a endoteliálních buňkách (Sirén *et al.*, 2000). Díky ischemickým faktorům, kterými jsou trombin, hemoglobin, transformující růstový faktor beta a TNF-alfa, je zvyšována exprese ET-1 genů (Giuffrida *et al.*, 1992) a naopak NO a cGMP jeho expresi snižuje.

Injekce ET-1 do mozkové tkáně způsobuje výrazné snížení krevního průtoku a následný vznik léze u dospělých zvířat (Fuxe *et al.*, 1992). U neanestezovaných volně pohyblivých zvířat vyvolává behaviorální křečové projevy (Nagasaka *et al.*, 1999), které byly rovněž zjištěny i u mláďat laboratorního potkana, kde korelovaly s ischemií indukovanými záchvaty patrnými na EEG (Mátéffiová *et al.*, 2006; Tsenov *et al.*, 2007). V důsledku ET-1 indukované ischemie dochází u dospělých zvířat k nárůstu hladin aminokyselin, hlavně glutamátu, aspartátu (Bogaert *et al.*, 2000), laktátu, pyruvátu a produktů glutamátu, kterými jsou mj. alanin a taurin (van Hemelrijck *et al.*, 2005a, van Hemelrijck *et al.*, 2005b). Zatím nebyl jednoznačně prokázán přímý neurotoxický účinek ET-1 (Lustig *et al.*, 1992), avšak přímá inhibice gliálních glutamátových transportérů a následný vzestup hladiny glutamátu se může podílet na jeho vývoji (Rozyczka *et al.*, 2004).

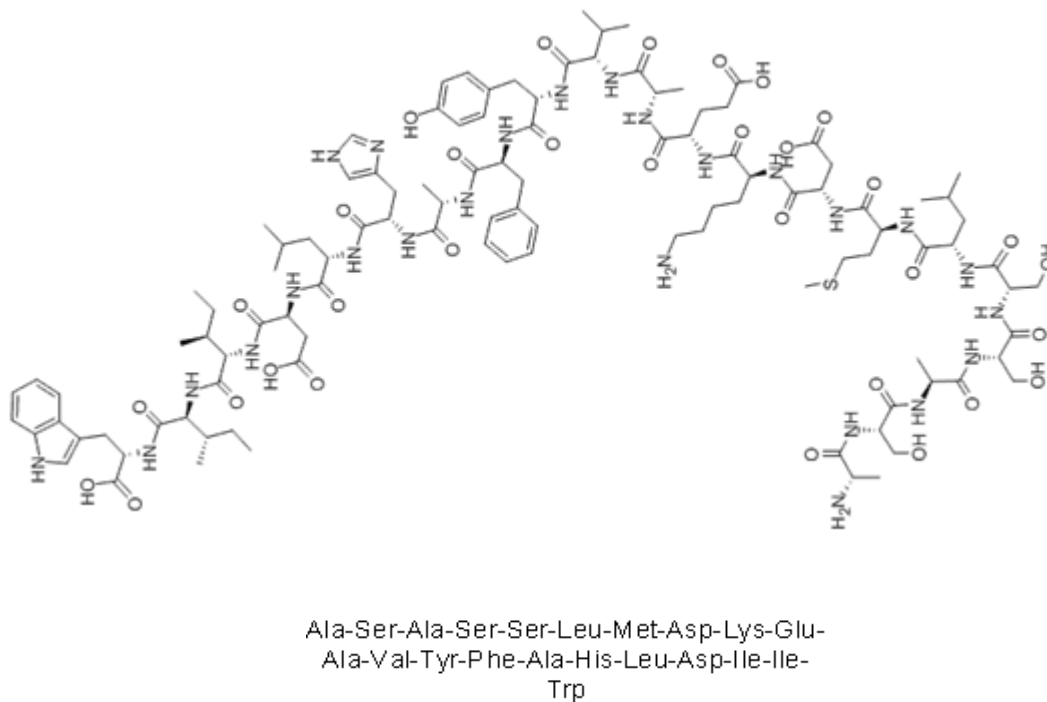
5.5 Farmakologie endotelinových receptorů

Celá řada synteticky vytvořených agonistů a antagonistů endotelinových receptorů nám umožňuje studovat širokospektrální působení endotelinů *in vivo* a *in vitro*.

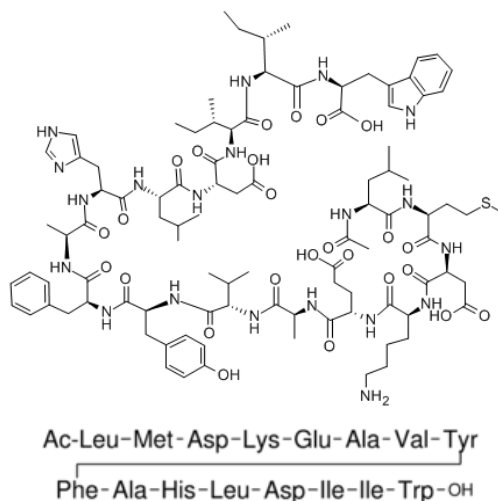
⁶ spojení buněk tvořené kanálky (konexony), slouží k signalizaci mezi buňkami (el. signály, chemické látky)

5.5.1 Agonisté endotelinových receptorů

Selektivní agonista ET_A receptorů nebyl zatím doposud vytvořen, proto se pro účel agonismu těchto receptorů používá neselektivní ET-1. Známé jsou pouze agonisté ET_B receptorů, mezi které patří sarafotoxin-6b, vysoce kardiotoxický homolog endotelinů, který je izolován z hadího jedu a způsobuje velmi silnou vazokonstrikci (*Strachan et al.*, 2000). Modifikovaný ET-1 se substituovaným alaninovým zbytkem, [Ala^{1,3,11,15}]-ET-1 (dále 4-Ala-ET-1; Obrázek č. 9), BQ3020 (viz obrázek č. 10; *Strachan et al.*, 2000) a IRL1620 jsou dalšími zástupci agonistů selektivně se vážící na ET_B receptory. Tyto peptidy umožňují sledování úlohy ET_B receptorů v procesech následujících po vazbě ET-1.



Obrázek 9. Struktura [Ala^{1,3,11,15}]-ET-1 (zdroj www.chemicalbook.com; www.tocris.com).



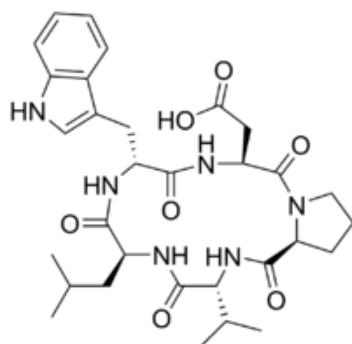
Obrázek 10. Struktura BQ3020 (zdroj chemicalbook.com; sigmaaldrich.com).

5.5.2 Antagonisté endotelinových receptorů

Antagonisté endotelinových receptorů vykazují neuroprotektivní účinky a snižují poškození mozku po mozkové fokální ischemii (*Patel et al., 1996; Dawson et al., 1999*). Selektivní ET nebo neselektivní antagonisté ET_A/ET_B receptorů zvyšují krevní průtok a snižují velikost infarktované oblasti (*Patel et al., 1996*).

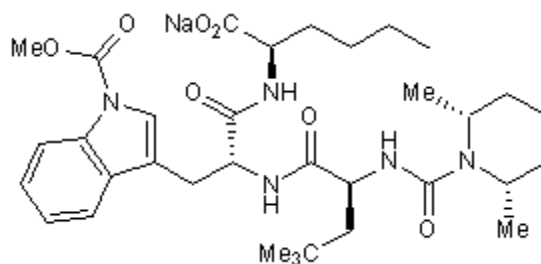
Mezi antagonisty ET_A receptorů patří BQ123 (Obrázek č. 11), ZD4054, atrasentan, darusentan, macisentan, ambrisentan a sixsentan, naopak BQ788 (Obrázek č. 12), A192621, RES7011 nebo IRL2500 zajišťují antagonismus ET_B receptorů.

V našich experimentech jsme ke zjištění funkce ET_A a ET_B receptorů používali selektivní kompetitivní antagonisty BQ123 pro ET_A receptor a BQ788 pro ET_B receptor. BQ788 je selektivní inhibitor vazby endotelinu na ET_B receptory. V *in vitro* podmínkách byl popsán jako silný, kompetitivní, ET-specifický, ET_B selektivní antagonista bez agonistické aktivity (*Ishikawa et al., 1994*). Kompetitivní antagonista selektivní k ET_A receptorům (BQ123) v nanomolárních koncentracích (od 15 nmol; *Nagasaka et al., 1999*) inhibuje vazbu ET-1 na ET_A receptory a tím i ET_A indukovanou konstrikci (*Ihara et al., 1992*).



Cyclo(D-Trp-D-Asp-Pro-D-Val-Leu)

Obrázek 11. Struktura BQ123 (zdroj wikipedia.com, tocris.com).



Obrázek 12. Struktura BQ788 – N-[(cis-2,6-Dimethyl-1-piperidiny)carbonyl]-4-methyl-L-leucyl-1-(methoxycarbonyl)-D-tryptophyl-D-norleucine sodium salt (zdroj tocris.com).

Shrnutí

Porozumění mechanismům vzniku, průběhu a důsledků fokální ischemie v nezralém mozku představuje stále aktuální problematiku jak pro klinické, tak experimentální pracoviště. Využití experimentálního endotelinového modelu fokální ischemie, který je považován za vysoce reprodukovatelný model cerebrální ischemie u lidí, představuje jednu z možností detailního výzkumu takových mechanismů a důsledků fokální ischemie. Současný stav poznání ohledně úlohy endotelinových receptorů v nezralém mozku v průběhu ischemie je nedostatečně objasněn. Rovněž chybí i bližší údaje o časovém průběhu fokální cerebrální ischemie indukující změny cerebrálního krevního průtoku, saturace kyslíku a lokálních biochemických parametrů (zejména změny hladiny glutamátu). Také jsme nemohli přehlédnout fakt, že dospělý i nezralý hipokampus je velmi náchylný k ischemicko-hypoxickému poškození, což bylo prokázáno jak v klinické praxi, tak i v celé řadě animálních studií ischemicko-hypoxického infarktu (*Walsh & Emerich, 1988; Ben-Ari, 1992*). Mimo jiné je tato struktura velmi důležitá pro paměť a prostorovou orientaci a její postižení či změny v normálním fyziologickém vývoji mohou mít dlouhotrvající následky, např. mohou vést ke vzniku epilepsie (*Lynch et al., 2002*). V řadě experimentálních studií provedených na dospělých laboratorních zvířatech bylo ukázáno, že infuze ET-1 do mozkové tkáně způsobuje výrazné snížení krevního průtoku a následný vznik léze (*Fuxe et al., 1992*). Také dochází ke změnám hladin metabolitů, především aminokyselin (*Bogaert et al., 2000; van Hemelrijck et al., 2005a; van Hemelrijck et al., 2005b*). V neposlední řadě bylo prokázáno, že infuze endotelinu-1 do mozkové tkáně vede k rozvoji symptomatických záchvatů u volně pohyblivých zvířat (*Gross & Weaver, 1993; Chew et al., 1995*). Tyto symptomatické akutní záchvaty doprovázené behaviorálními projevy a morfologickým poškozením způsobené unilaterální intrahipokampální infuzí ET-1 byly popsány i u mláďat laboratorního potkana (*Mátéffyová et al., 2006; Tsenov et al., 2007*), kde zatím chybí detailní popis mechanismů vzniku těchto záchvatů.

Využití modelu cévní mozkové příhody indukované aplikací silného vazokonstriktoru, endotelinu-1 (ET-1), v animálním modelu fokální cerebrální ischemie v nezralém hipokampu by mohlo přispět ke studiu akutních i dlouhodobých následků perinatální cerebrální ischemie

(tj. neuronální poškození, poškození paměti, epileptogeneze, lokální metabolické změny apod.).

S ohledem na výše zmíněná fakta jsme se rozhodli použít *in vivo* animální model fokální cerebrální ischemie, navozený unilaterální intrahipokampální infuzí endotelinu-1 (ET-1) do mozku 12. denního potkana.

Hypotéza

Předpokládáme, že za neurodegenerativní poškození je zodpovědná zvýšená hladina glutamátu, která vzniká v důsledku bezprostřední aktivace endotelinových receptorů typu A při intrahipokampální infuzi endotelinu-1 a následných hypoxicko-ischemických změn v nezralém hipokampu.

Cíle práce

1. Stanovení role ET_A a ET_B receptorů při změnách saturace kyslíku během fokální ischemie navozené aplikací ET-1.
2. Stanovení role ET_A a ET_B receptorů při změnách lokálního krevního průtoku během fokální ischemie navozené aplikací ET-1.
3. Stanovení role ET_A a ET_B receptorů při změnách hladin metabolitů pomocí mikrodialýzy během fokální ischemie navozené aplikací ET-1.
4. Zjistit vliv fokální ischemie vyvolané intrahipokampální infuzí ET-1 na míru neurodegenerace v hipokampu u mláďat laboratorního potkana.

6 Metodika

6.1 Experimentální zvířata

Experimenty byly prováděny na 12. denních (P12) samcích potkanů kmene Wistar pocházejících z chovů z Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky (CZ 11760353 a 1398/2014-MZE-17214). Den narození byl stanoven jako den 0. Zvířata byla chována v kontrolovaných podmínkách (teplota 22 ± 1 °C, vlhkost 50 - 60 %, světlo od 6:00 - 18:00 h) s volným přístupem k vodě a potravě. Experimenty byly schváleny Výborem pro ochranu zvířat na Fyziologickém ústavu Akademie věd České republiky (číslo schválení 095/2010). Fyziologický ústav vlastní NIH prohlášení o shodě s normami pro humánní péči a používání laboratorních zvířat č.j. A5820-01 platící do 31. ledna 2014 a nově 1396/2014-MZE-17214 platící do 31. prosince 2018. Péče o zvířata a experimentální postupy jsou prováděny v souladu s pokyny Evropského společenství směrnic Rady 86/609/EEC.

V pokusech bylo celkem využito 182 zvířat a jednotlivé experimentální skupiny se skládaly z 6 až 8 pokusných zvířat pro každý konkrétní typ experimentu.

6.2 Použité látky

Fokální ischemie byla vyvolána pomocí lokální infuze ET-1 (Sigma-Aldrich # E7764 St. Louis, MO, USA) rozpuštěného v 10 mM PBS v koncentraci 40 pmol v celkovém objemu 1 μ l do dorzálního hipokampu.

Pro zjištění rolí ET_A a ET_B receptorů při ischemii byly použity:

a) selektivní agonisté ET_B receptorů

- [Ala^{1,3,11,15}]-ET-1 rozpuštěný v 10 mM PBS, v koncentraci 40 pmol nebo 10 pmol v celkovém objemu 1 μ l; Tocris Bioscience #1197, Bristol, UK.
- BQ3020 rozpuštěný v 10 mM PBS, v koncentraci 40 pmol v celkovém objemu 1 μ l; Sigma-Aldrich #79382, St. Louis, MO, USA.

b) selektivní antagonist ET_A receptorů

- BQ123 rozpuštěný v 10 mM PBS v koncentraci 70 nmol v celkovém objemu 1 μ l; Tocris Bioscience, Bristol, UK.
- c) selektivní antagonisty ET_B receptorů
- BQ788 rozpuštěný v 0,01% DMSO-PBS v koncentraci 70 nmol v celkovém objemu 1 μ l, Tocris Bioscience #1500, Bristol, UK.
- d) kontrolní roztoky (rozpuštědla)
- PBS (Phosphate Buffered Saline) v koncentraci 10 mM v celkovém objemu 1 μ l nebo 2 μ l; pH 7.4; Sigma-Aldrich #79382, St. Louis, MO, USA.
 - 0,01% DMSO-PBS v celkovém objemu 1 μ l; Dimetyl sulfoxid - Sigma-Aldrich #W387509, St. Louis, MO, USA.

Antagonisté ET_A a ET_B receptorů byly podávány simultánně s infuzí 1 μ l ET-1 (v koncentraci 40 pmol/1 μ l), kvůli vysoké citlivosti pO_2 senzoru a sondy na měření krevního průtoku na pohyby spojenými s extrakcí a inzercí kanyly. Malé množství (15 - 20 μ l) čerstvě připravených roztoků bylo zmrazeno a uchováváno při -20 °C, dokud nebylo použito. V den experimentu, krátce před pokusem, bylo požadované množství roztoku rozmrazeno na pokojovou teplotu. Po rozmražení zbylé roztoky nebyly již nepoužity. Kontrolním zvířatům byl injikován 10 mM PBS nebo 0,01% DMSO-PBS v celkovém objemu srovnatelném s experimentálními skupinami, tj. 1 μ l či 2 μ l.

6.3 Chirurgický zákrok

Veškeré chirurgické zákroky byly prováděny při izofuranové anestezii (1,5 - 2,0 %; #B306, Abbot Laboratories, Queenborough, UK). Zvířata byla umístěna do stereotaktického aparátu a kanyla byla zavedena do dorzálního hipokampu v souřadnicích přepočtených ze souřadnic dospělých zvířat dle vzdálenosti bregma-lambda (AP=3,7; L=3,0; H=3,5 mm podle Paxinos & Watson, 1998). Podrobnější detaily dalšího postupu jsou popsány v jednotlivých experimentech. Během všech experimentů byla zvířata udržována při teplotě hnízda ($34 \pm 0,5$ °C) pomocí vyhřívané podložky s automatickým udržování žádané teploty (Supratech engineering, Maďarsko). Infuze látek byla provedena pomocí pumpy (kdS SP20012, WPI - World Precision Instrument, USA) s konstantní rychlostí aplikace (0,25

μl/min). Na konci každého akutního experimentu byla zvířata humánně usmrcena intraperitoneálním podáním uretanu (2 g/kg, i. p., #U2500, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), aniž by se probudila. Mozky byly vyjmuty a na dobu jednoho týdne umístěny do 8% formalinu (#47629, Penta, Česká republika). Histologický materiál byl následně zpracován pro zjištění vzájemné polohy kanyly a sondy (viz kapitola 6.4. Histologie).

6.4 Histologie

V nezávislém experimentu (studium neurodegenerace) byly zvířatům v mírné izofuranové anestezii infundovány vybrané látky (ET-1; 4-Ala-ET-1; BQ123 či BQ788 v kombinaci s ET-1; PBS a DMSO-PBS). Agonisté ET receptorů byly infundovány v koncentraci 40 pmol a celkovém objemu 1 μl, selektivní antagonisté byly podány v koncentraci 70 nmol na 1 μl v kombinaci s ET-1 (40 pmol/1 μl). Rozpouštědla byla infundována v objemech popsaných v kapitole 6.2. Chirurgický zákrok a infuze látek byly provedeny, jak bylo popsáno v kapitole 6.3. Minutu po ukončení infuze byla kanyla vyjmuta, skalp byl slepen pomocí organického lepidla (#09986, Collodium, Penta, Česká republika), anestezie byla ukončena a po 90 minutách video monitorování chování byla zvířata navrácena matce. Po celou dobu pokusu se zvířata nacházela na vyhřívané podložce. Dvacet čtyři hodin po intrahipokampální infuzi byla zvířata humánně usmrcena intraperitoneálním podáním uretanu (#U2500, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) v dávce 2 g/kg a transkardiálně zperfundována pufovaným roztokem 4% paraformaldehydu (#P6148, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Mozky byly vyjmuty a po dobu 3 hodin postfixovány v pufovaném roztoku 4% paraformaldehydu. Následně byl použit sacharózový gradient (10%, 20% a 30%; #40135-APO, Lach:ner, Česká republika) kvůli kryoprotekci. Mozky byly následně zmrazeny a uschovány při -80 °C pro další zpracování. Pomocí mikrotomu Leica byly mozky při -20 °C nakrájeny na koronární řezy (50 μm) do 1-5 sérií. Všechny řezy byly ukládány v kryoprotektivním roztoku při -20 °C do doby barvení. Následně byla jedna série řezů obarvena Nisslovou metodou (kresylovou violetí; #C5042, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), další série řezů byla obarvena pomocí markeru degenerujících neuronů (Fluoro-Jade B barvení; Fluoro-Jade B, HISTO-CHEM INC., USA) a na těchto řezech byla následně analyzována míra poškození hipokampu.

6.4.1 Barvení podle Nissla

Barvení Nisslovou metodou je klasická histologická metoda, nejčastěji používaná pro barvení nervové tkáně. Základní barvivo (kresylová violet, anilin nebo thionin) se váže na negativně nabitě nukleové kyseliny (RNA i DNA), čímž umožňuje detekovat buněčné struktury, kterými jsou např. jádro či endoplazmatické retikulum.

6.4.1.1 Postup barvení

Mozkové řezy byly namontovány na želatinou potažená podložní skla a po uschnutí obarveny kresylovou violetí. Skla s řezy se 1-4 hodiny nechala ve směsi 96% etanolu a chloroformu v poměru 1:1. Dále byly řezy rehydratovány klesajícími koncentracemi alkoholu (100%, 90% a 70%), následovalo krátké opláchnutí mírně okyselenou destilovanou vodou a po obarvování kresylovou violetí a opláchnutí okyselenou vodou následovala dehydratace řezů vzrůstajícími koncentracemi alkoholu (70%, 90% a 100%). Následně byly řezy krátce opláchnuty směsí acetonu a xylenu v různých poměrech (2:1, 1:1 a 1:2). Poté byly řezy opláchnuty a uloženy v xylenu nejlépe do druhého dne. Na obarvená skla byla poté Solakrylem montována krycí sklíčka. Protokol postupu barvení je přiložen v příloze (Příloha č. 1).

6.4.2 Fluoro-Jade B barvení

Fluoro-Jade B barvení (FJB) je fluorescenční histologická technika, umožňující detekci degenerujících neuronů (*Schmued & Hopkins, 2000; Butler et al., 2002*), přesný mechanismus barvení ovšem zůstává neznámý. FJB barví těla neuronů, dendrity, axony i synaptická zakončení, ale dokáže detekovat i neurony nacházející se mimo CNS, astrocyty nebo mikroglie.

6.4.2.1 Postup barvení

Natažené řezy na želatinových sklech se nechaly přes noc usušit a druhý den se rehydratovaly klesajícími koncentracemi alkoholu (100% a 70%). Ke snížení pozadí barvení a k ochraně řezů před vyblednutím byl použit 0,06% roztok manganistanu draselného. Poté se FJB rozpustil v destilované vodě (do finální koncentrace 0,001%) a aby byl specifický pro

degenerující neurony musel být FJB použit v kyselém prostředí (0,1% kyselině octové). Následně byla sklíčka opláchnuta vodou a přes noc sušena při 37 °C. Druhý den byla sklíčka vložena do xylenu a následně překryta krycími sklíčky. Protokol postupu barvení je přiložen v příloze (Příloha č. 2).

6.5 Použité metody

6.5.1 Měření saturace kyslíku v tkáni

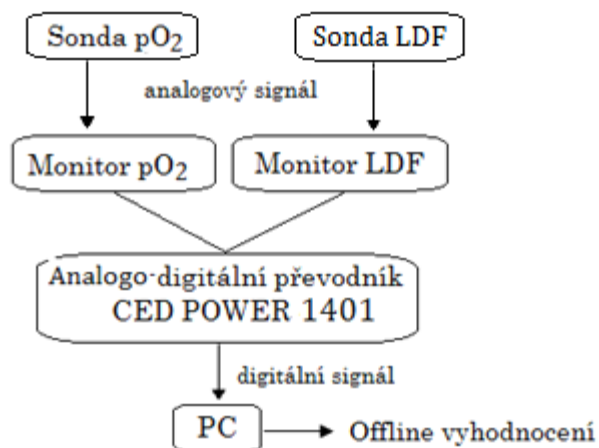
Pro měření saturace kyslíku byl využit přístroj Oxylab pO₂, který umožňoval kvantitativní měření parciálního tlaku rozpuštěného kyslíku případně i teploty v tkáních, fyziologické tekutině, buněčných kulturách a *in vitro* vzorcích.

Měřicí zařízení (viz obrázek č. 13) se skládalo z monitoru a oddělitelné, jednorázové sondy s maximální dobou svítivosti 24 hodin. Monitor obsahoval zdroj modrého světla, citlivý fotodetektor a mikroprocesor na zpracování signálu. Samotná sonda se skládala z jednoho optického vlákna s luminiscenční diodou na distálním konci. Tato sonda obsahovala luminiscenční barvu uloženou v polymerovém matrixu a excitovala modré světlo z monitoru pO₂. Na základě prodlevy luminiscence, která byla v přímé souvislosti s mírou okysličenosti tkáně, mikroprocesor zpracovával příchozí signál a vypočítával odpovídající hladinu saturace kyslíku. Naměřené hodnoty byly posléze zdigitalizovány pomocí analogo-digitálního převodníku (A/D převodník; CED, Power 1401, Cambridge, UK) a následně vyhodnoceny (viz kapitola 7.2 Analýza a zpracování dat).

6.5.2 Měření regionálního krevního průtoku

Pro měření cerebrálního regionálního krevního průtoku (RKP) byl použit monitor PeriFlux 5000 (Perimed, Švédsko), využívající pro detekci Doplerovskou metodu, tj. porovnání vyzářeného a odraženého světla. Tento přístroj obsahoval zdroj červeného světla, citlivý fotodetektor a mikroprocesor na zpracování signálu. K tomuto monitoru byla zapojena sonda (viz obrázek č. 13), která obsahovala optická vlákna, z nichž byla část určena pro přenos světla směrem k distálnímu konci sondy a část vláken sloužila k detekci odraženého světla. Při odrazu světla od pohybujících se objektů, konkrétně od červených krvinek, vysílaný červený

koherentní paprsek měnil svou vlnovou délku. Světelný signál odražený od červených krvinek byl přenesen zpětně optickým vláknem do fotodetektoru a zpracován v mikroprocesoru. Naměřené hodnoty byly posléze zdigitalizovány pomocí A/D převodníku (CED, Power 1401, Cambridge, UK), nahrány do PC a následně vyhodnoceny (viz kapitola 7.2 Analýza a zpracování dat).

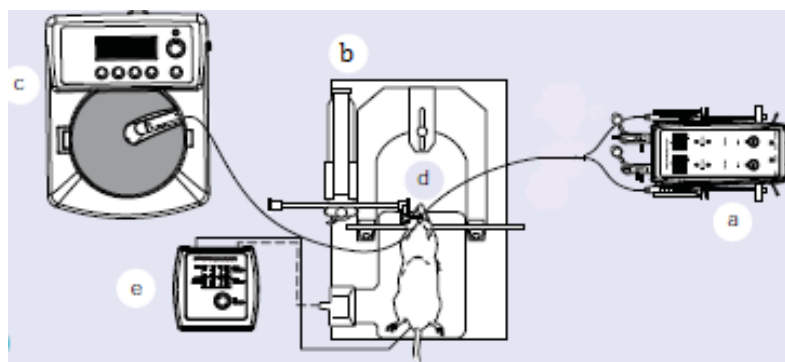


Obrázek 13. Schéma zapojení přístrojů při měření RKP a pO₂.

6.5.3 Mikrodialýza

Mikrodialýza je *in vivo* bioanalytická metoda umožňující akutní i dlouhodobé *in vivo* monitorování biochemických změn v orgánu či tkáni. Jedná se o nejšetrnější metodu pro *in vivo* monitorování biochemických procesů eliminující nepříznivé tkáňové reakce. Velké využití nalézá také v klinickém výzkumu. Použitý mikrodialyzační systém se skládal z pumpy, kolektoru vzorků a samotné mikrodialyzační sondy (viz obrázek č. 14).

Mikrodialyzační technika je založena na principu volného prostupu metabolitů a iontů přes membránu dle koncentračního spádu. Tato metoda je neinvazivní, protože při ní nedochází k odběru tkáně či tělních tekutin. Pomocí pumpy byla sonda konstantní rychlostí promývána perfuzním roztokem o stejném složení jako cerebrospinální tekutina a výsledný dialyzát byl v určitých časových úsecích sbírán do chladicího kolektoru. Vzorky dialyzátů byly následně uchovávány při -80 °C, dokud nebyly zanalyzovány (viz kapitola 7.2.2).



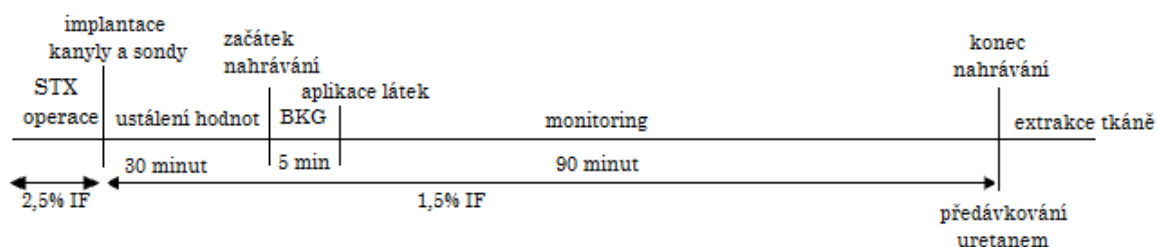
Obrázek 14. Schéma zapojení přístrojů při mikrodialýze (upraveno podle CMA microdialysis www.microdialysis.se).

a - mikrodialyzační pumpa, **b** - stereotaktický aparát, **c** - chladicí kolektor, **d** - mikrodialyzační sonda implantovaná do hipokampu potkana, **e** - vyhřívaná podložka s interním čidlem teploty

7 Experimenty

7.1 Popis experimentálních postupů

Experiment 1. Stanovení změn lokálního krevního průtoku po aplikaci nižších koncentrací vybraných látek



Obrázek 15. Časové uspořádání experimentu měření pO_2 a LDF.

Operační zákrok byl proveden dle dřívějšího popisu v kapitole 6.3. Zvířatům byla stereotakticky do pravého dorzálního hipokampu zavedena kanyla (Plastic One Inc.

#C315IA/SP, Rianoke, USA) a jehlová sonda pro měření RKP (# 415-346, Perimed, Stockholm, Švédsko) ve vzdálenosti 500 - 700 μm (v průměru) kaudálně od kanyly. Po zavedení sondy a kanyly byla izofuranová anestezie snížena na 1,5 % a po dobu 30 minut bylo umožněno „recovery“⁷ hladiny RKP. Po ustálení této hladiny bylo započato měření/registrace (viz obrázek č. 15). Látky byly infundovány 5 minut od začátku nahrávání a celková doba monitorování čítala 95 minut. Zvířatům byl podán 10 pmol ET-1 v celkovém objemu 1 μl nebo 10 pmol 4-Ala-ET-1 v objemu 1 μl . Kontrolní skupině byl infundován 1 μl fosfátového pufru s pH 7.4. Naměřené hodnoty byly znormalizovány na bazální hodnoty a vyhodnoceny pomocí programu Matlab (viz kapitola 7.2 Analýza a zpracování dat). Po ukončení experimentu byla vyjmuta mozková tkáň (viz kapitola 6.4 Histologie) a po nakrájení na koronární řezy byla jedna série řezů obarvena kresylovou violetí (barvení podle Nissla, postup barvení viz kapitola 6.4 Histologie a Příloha č. 1).

Experiment 2. Stanovení role ET_A a ET_B receptorů při změnách lokálního krevního průtoku během fokální ischemie navozené aplikací ET-1

Změny regionálního krevního průtoku (RKP), způsobené intrahipokampálním podáním ET-1 a antagonistů ET receptorů, byly měřeny obdobně jako při Experimentu č. 1. Neselektivní agonista ET receptorů, ET-1, byl infundován samotný v koncentraci 40 pmol/1 μl nebo v kombinaci se selektivními antagonisty ET_A či ET_B receptorů (v koncentracích popsaných v kapitole 6.2). Selektivní agonisté ET_B receptorů BQ3020 a 4-Ala-ET-1 byly infundovány v koncentraci 40 pmol a celkovém objemu 1 μl . Kontrolním zvířatům byl injikován odpovídající objem příslušného rozpouštědla (1 či 2 μl) PBS nebo 0,01% DMSO-PBS. Data z každého měření byla znormalizována na bazální hodnoty a vyhodnocena pomocí programu Matlab (viz kapitola 7.2 Analýza a zpracování dat).

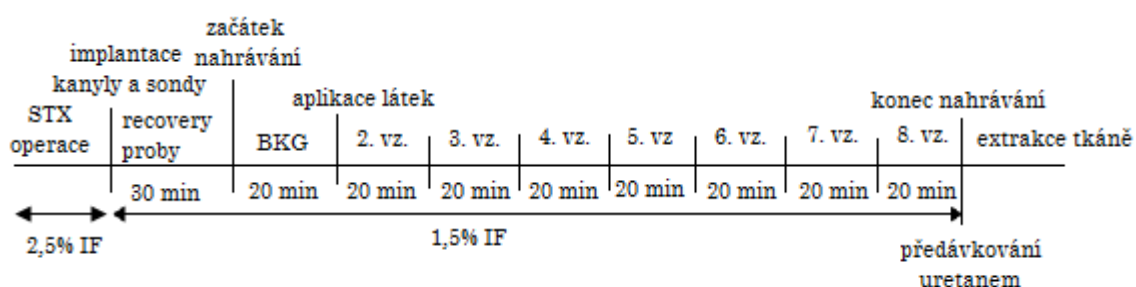
Experiment 3. Stanovení role ET_A a ET_B receptorů při změnách saturace kyslíku během fokální ischemie navozené aplikací ET-1

Operační zákrok a způsob měření saturace kyslíku proběhly obdobně jako v experimentu č. 1 a 2. (viz obrázek č. 15) s tím rozdílem, že místo jehlové sondy byla kaudálně od kanyly

⁷ ustálení hladiny

zavedena sonda pro měření saturace kyslíku (BF/pO₂ sensor, Oxford Optonix, UK). Po dokončení měření byla zvířata usmrcena injekcí uretanu a byl odebrán histologický materiál, jak je popsáno v kapitole 6.3. Chirurgický zákrok. Data z každého měření byla znormalizována na bazální hodnoty a vyhodnocena pomocí programu Matlab (viz kapitola 7.2 Analýza a zpracování dat).

Experiment 4. Stanovení role ET_A a ET_B receptorů při změnách hladin metabolitů pomocí mikrodialýzy během fokální ischemie navozené aplikací ET-1



Obrázek 16. Časové uspořádání experimentu mikrodialýzy.

Operační zákrok a zavedení kanyly bylo provedeno stejným způsobem jako v Experimentu č. 1, s jedinou výjimkou, že s ohledem na mechanickou citlivost membrány na konci mikrodialyzační sondy byl opatrně vytvořen otvor v lebce (cca 1,5 mm x 1,5 mm), opatrně odtáženy mozkové obaly a místo sondy na měření RKP kaudálně od kanyly do pravého dorzálního hipokampu byla stereotakticky zavedena mikrodialyzační sonda s kuprofanovou membránou s propustností 6 kDa a délkou 1 mm (#P000082; CMA7, CMA microdialysis, Švédsko). MD sonda byla napojena na perfuzní pumpu a chlazený kolektor. Sonda byla promývána perfuzním roztokem (#P000151; CNS perfusion fluid, CMA microdialysis, Švédsko) o stejném složení jako cerebrospinální tekutina konstantní rychlostí 1,5 µl/min. Jednotlivé dialyzační frakce byly odebírány s intervalem 20 minut (tj. celkem 30 µl dialyzátu) po dobu 2 hodin po ukončení intrahipokampální infuze látky/látek (viz obrázek č. 16). Celkem bylo odebráno 8 vzorků u každého pokusného zvířete, z toho první vzorek byl z období před infuzí látky/látek do hipokampu.

Výsledné koncentrace analytů byly znormalizovány vůči průměru bazálních hodnot (tj. z prvních vzorků) a vyhodnoceny, jak je popsáno v kapitole 7.2 Analýza a zpracování dat. Získané výsledky měření hladin metabolitů ve vzorcích č. 8 (poslední) sloužily pro vývoj metody (upřesnění protokolu, kontrolu kalibrace přístroje, kontrolu celistvosti membrány apod.) a z tohoto důvodu nejsou tato data uvedena v této diplomové práci.

Experiment 5. Analýza degenerujících neuronů pomocí Fluoro-Jade B barvení po fokální ischemii

Jedna série řezů byla obarvena Fluoro-Jade B barvením (postup viz kapitola 6.4 Histologie a Příloha č. 2) pro zjištění míry degenerujících buněk po navozené ischemii. Míra poškození byla vyjádřena jako procento hipokampální oblasti (CA1 - *cornu ammonis 1*, CA3 - *cornu ammonis 3*, *hilus*, *gyrus dentatus*) obsahující FJB pozitivní neurony, podle škály poškození hipokampální oblasti: **0** – 0-5 %; **1** – 6-25 %; **2** – 26-50 %; **3** – 51-75 %; **4** - >75 % (Tsenov *et al.*, 2007). Míra poškození byla vypočtena pro každou oblast zvlášť a následně sečtena pro každé zvíře. Celková míra poškození pro jednotlivé zvíře se tedy pohybovala od 0-16.

7.2 Analýza a zpracování dat

7.2.1 Analýza měření RKP a pO₂

Analýza výsledků změn saturace kyslíku a regionálního krevního průtoku byla provedena pomocí programu Matlab (Mathwork, Natick, USA). Změny regionálního krevního průtoku a saturace kyslíku byly hodnoceny po normalizaci vůči průměru bazálních hodnot (před infuzí látky) pro každé konkrétní měření. Z každé jednotlivé křivky (obrázky č. 17 - 19, části A) byl následně vypočten integrál (plocha pod křivkou za celý čas měření, viz obrázky č. 17 - 19, části B). Na obrázcích č. 17 - 19 v částech B je znázorněna celková plocha pod křivkou v absolutních hodnotách. Detaily poklesu nebo nárůstu jsou znázorněny v částech A jmenovaných obrázků. Takto získaná data z jednotlivých skupin byla následně statisticky vyhodnocena, jak je popsáno níže (7.2.4. Statistická analýza).

7.2.2 Analýza mikrodialyzačních vzorků

Analýza mikrodialyzačních vzorků byla prováděna pomocí aTRAQ kitu pro analýzu aminokyselin ve fyziologickém roztoku (AB Sciex, Framingham, USA) podle instrukcí výrobce pouze s menšími modifikacemi (viz příloha č. 3). Pro zvýšení výnosu aminokyselin, bylo 30 μ l dialyzátu okyseleno 10% kyselinou sulfosalicylovou obsahující norleucin v celkovém objemu 1 μ l a k dosažení pH 8,5 před barvicí reakcí bylo přidáno 5 μ l boritého pufru obsahující norvalin. Nefyziologické aminokyseliny (norleucin a norvalin) byly použity k zajištění vyšší účinnosti barvení, přičemž nebyl vysrážen žádný protein. Isopropanol (140 μ l) a aTRAQ reagent Δ 8 (barvicí složka; 5 μ l) byl přidán do každého vzorku a inkubován 30 minut. Barvicí reakce byla ukončena přidáním 5 μ l hydroxylaminu. Nabarvené vzorky byly následně naředěny aTRAQ standartním roztokem (5 μ l) a uloženy při - 20 °C, dokud nebyly zanalyzovány.

Nabarvené aminokyseliny byly rozděleny pomocí kapalné chromatografie (Dionex UltiMate 3000 RSLC s Kinetex C18 kolonou, 100x2.1 mm, 2.6 μ m (Phenomenex) s C18 pre-kolonou). Chromatografické detekční podmínky byly nastaveny v souladu s doporučením výrobce aTRAQ kitu. Detekce a identifikace aminokyselin bylo dosaženo použitím AB Sciex QTRAP 5500, tandemového hmotnostního spektrometru, pracujícího v režimu pozitivní ionizace s použitím režimu sledování vícenásobných reakcí (MRM) na základě pokynů výrobce. Pro detekci a identifikaci aminokyselin byl použit software Analyst 1.6.1 (AB Sciex). Pro přesnější vyjádření našich výsledků a pro porovnání našich výsledků s literaturou jsme použili metodický postup, který je uveden v pracích (*van Hemelrijck et al., 2005a; van Hemelrijck et al., 2005b*), s mírnou modifikací. Znormalizovali jsme získané hodnoty koncentrací AK (pouze u dopaminu byla z technických důvodů měřena plocha pod křivkou) z jednotlivých měření na průměr všech bazálních hladin (tj. průměr všech prvních vzorků před podáním látky). Další postup zůstal stejný jako v citované metodice, tj. hodnoty z první (3 vzorky od každého potkana) a druhé (3 vzorky od každého potkana) hodiny měření po aplikaci látky byly zprůměrovány a následně statisticky zpracovány, jak je popsáno níže.

7.2.3 Mikroskopie

Řezy obarvené Nisslovou metodou byly vyhodnoceny mikroskopicky kvůli verifikaci vzdálenosti kanyly a průb pro měření saturace kyslíku, krevního průtoku a mikrodialýzy. Obdobně byly vyhodnoceny řezy obarvené Fluoro-Jade B. K analýze řezů obarvených Fluoro-Jade B byl použit mikroskop BX40 (Olympus, Shinjuku, Tokio, Japonsko) vybavený U-MWIB filtrem, fluorescenční lampou U-RFL-T (Olympus, Japonsko) a objektivy PLAPON2x, UPLSAPO20x a UPLSAPO40x (Olympus, Japonsko). Digitální fotografie byly pořízeny na mikroskopu BX51 (Olympus, Japonsko) vybaveným CCD kamerou typu Retiga 2000R (#Q27865) se vzorem Bayer a filtrem Bayer8, fluorescenční Olympus U-RFL-T (Olympus, Japonsko) a objektivy PLAPON2x, UPLSAPO20x a UPLSAPO40x (Olympus, Japonsko). Obrázky byly importovány do Corel Draw X6 softwaru (Corel Corporation ©, USA) a 10x zkomprimovány do finálního rozlišení 648 x 648 dpi. U obrázků nebyl opravován jas či kontrast a nebyly provedeny žádné další úpravy kromě výše popsanych.

7.2.4 Statistická analýza

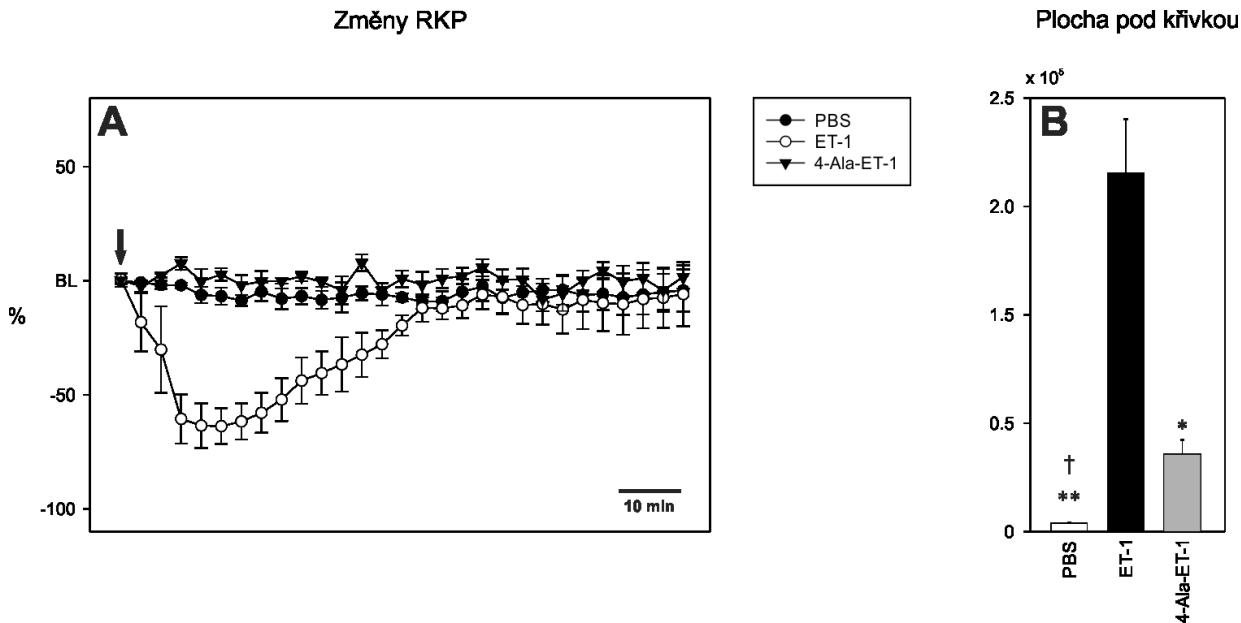
Výsledky jsou uváděny jako průměrné hodnoty se standardní odchylkou od průměru (S.E.M.), pouze na obrázku č. 22 jsou pro přehlednost uvedené standardní odchylky (SD). Na statistickou analýzu byl použit tzv. Mann-Whitney test. Incidence byla porovnána pomocí Fisherova exact testu. Korelace byla vypočtena pomocí Spearmanova rank testu. Na základě Grubbsova testu a Peircova kritéria (v obou případech míra signifikance byla stanovena na $p < 0,05$) ve výsledcích získaných z mikrodialyzačních měření byly vyloučeny hodnoty definované jako outliery. Tento postup je obecně uznávaným při statistickém zpracování výsledků (Ripley, 2004; Hodge & Austin, 2004) a rovněž umožňuje maximální seskupení/upřesnění získaných výsledků. Všechny parametry byly analyzovány pomocí softwaru GraphPad Prism v.6 (GraphPad Software Inc., CA, USA). Hodnota menší než 0,05 byla stanovena jako signifikantní.

8 Výsledky

Experiment 1. Stanovení změn lokálního krevního průtoku po aplikaci nižších koncentrací vybraných látek

V tomto experimentu šlo především o získání výsledků jak ohledně působení nižších koncentrací (10 pmol/1 μ l) neselektivního agonisty ET_A a ET_B receptorů (ET-1) a selektivního agonisty ET_B receptorů (4-Ala-ET-1), tak i pro výběr dalších koncentrací, které mají jasný a přetrvávající ischemický účinek. Sledovali jsme efekt zmíněných dvou agonistů ET receptorů na regionální krevní průtok v hipokampu 12. denních potkanů.

Infuze ET-1 (10 pmol/1 μ l) způsobila pokles regionálního krevního průtoku o $55 \pm 7 \%$ (n=6), který přetrvával přibližně 30 minut a v intervalu 40 minut po infuzi hladina RKP vrátila k bazálním hodnotám (viz obrázek č. 17). Oproti tomu podání 4-Ala-ET-1 (10 pmol/1 μ l; n=6) nebo PBS (n=4) v objemu 1 μ l vedlo pouze k mírnému poklesu hladiny RKP (v průměru o 3 - 6 %).



Obrázek 17. Změny regionálního krevního průtoku po podání 10 pmol/ μ l ET-1 a 10 pmol/ μ l 4-Ala-ET-1 a PBS.

A - Křivky označují průběh změn u různých skupin: kruh - 10 pmol/1 μ l ET-1, černé kolečko - 10 pmol/1 μ l 4-Ala-ET-1, trojúhelník - 10 mM PBS

A – křivky označují průběh změn u různých skupin: černé kolečko – PBS, bílý kruh – ET-1, černý trojúhelník – 4-Ala-ET-1, bílý trojúhelník – BQ3020, černý čtverec – BQ123 + ET-1, bílý čtverec – BQ788 + ET-1, černý kosočtverec – DMSO.

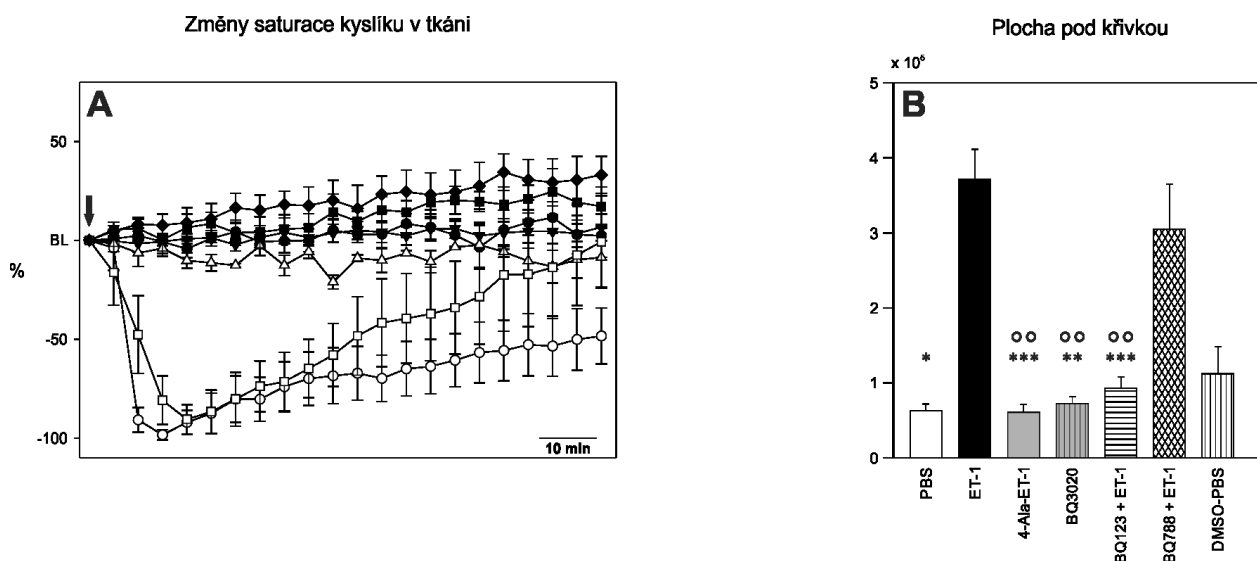
Změny jsou udávány v procentech poklesu (negativní) nebo nárůstu (pozitivní) RKP vztažené k bazální hladině (BL). **Časová značka** - 10 minut. **Černá šipka** - počátek hipokampální infuze. Celkové trvání experimentu - 80 minut.

B – Sloupce označují plochy pod křivkou jednotlivých skupin: bílý – PBS, černý – ET-1, šedý – 4-Ala-ET-1, šedý vertikálně pruhovaný – BQ3020, bílý horizontálně pruhovaný – BQ123 + ET-1, bílý mřížkovaný – BQ788 + ET-1, bílý vertikálně pruhovaný – DMSO-PBS. Plochy pod křivkou neznázorňují nárůst nebo pokles RKP oproti bazální hladině, ale celkovou plochu pod křivkou (v absolutních hodnotách).

Signifikance ($p < 0,05$) **hvězdička** - v porovnání se skupinou s ET-1, **kříž** - v porovnání se skupinou s 4-Ala-ET-1, **dvojitý kříž** - v porovnání se skupinou s BQ3020, **kruh** - v porovnání se skupinou s BQ788 + ET-1. Jeden symbol odpovídá míře signifikance - $p < 0,005$; dva symboly - $p < 0,01$.

Experiment 3: Stanovení role ET_A a ET_B receptorů při změnách saturace kyslíku během fokální ischemie navozené aplikací ET-1 (40 pmol/1 µl).

Infuze ET-1 ($n=8$) a BQ788 v kombinaci s ET-1 ($n=8$) se vyznačovala výrazným poklesem extracelulárního kyslíku o 90 ± 5 % v porovnání s ostatními skupinami (viz obrázek č. 19). Pokles začal okamžitě po aplikaci a návrat k původním hodnotám byl u zvířat, kterým bylo podáno BQ788 v kombinaci s ET-1, rychlejší (cca do 1,5 hodiny po aplikaci) než u zvířat, kterým byl podán samotný ET-1. U těchto zvířat bylo po 1,5 hodině dosaženo pouze 50 % původní hodnoty. U zvířat po podání PBS ($n=5$) nebo 4-Ala-ET-1 či BQ3020 ($n=6$) se hladina extracelulárního kyslíku téměř nezměnila. Obdobně tomu bylo u skupin, kterým byl podán 0,01% DMSO-PBS ($n=5$) nebo BQ123 v kombinaci s ET-1 ($n=8$), u kterých hladina pO_2 jen mírně vzrostla o 7 ± 3 %.



Obrázek 19. Změny saturace kyslíku po podání ET-1, agonistů ET_B receptorů, antagonistů ET_A a ET_B receptorů, PBS a DMSO-PBS.

A – křivky označují průběh změn u různých skupin: černé kolečko – PBS, bílý kruh – ET-1, černý trojúhelník – 4-Ala-ET-1, bílý trojúhelník – BQ3020, černý čtverec – BQ123 + ET-1, bílý čtverec – BQ788 + ET-1, kosočtverec – DMSO-PBS.

Změny jsou udávány v procentech poklesu (negativní) nebo nárůstu (pozitivní) pO_2 vztahené k bazální hladině (BL). Časová značka - 10 minut. Černá šipka - počátek hipokampální infuze. Celkové trvání experimentu - 95 minut.

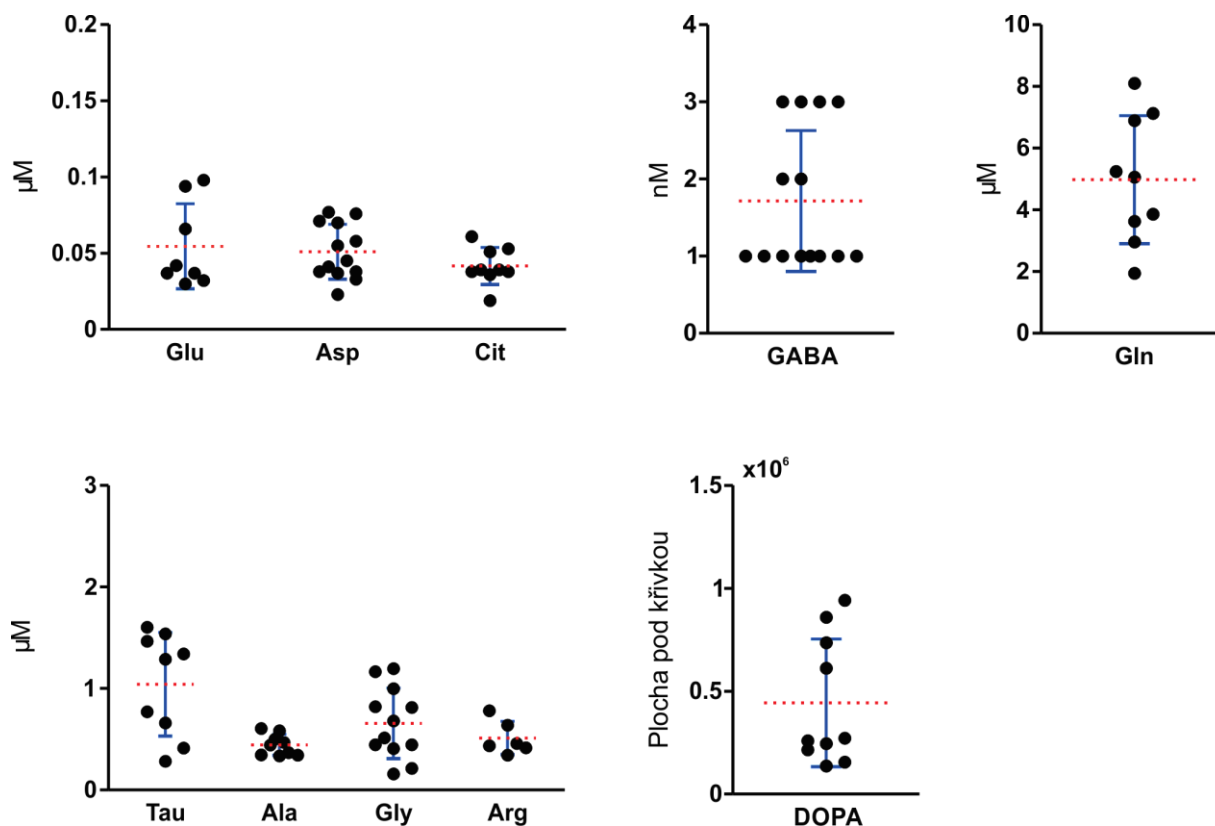
B – Sloupce označují plochy pod křivkou jednotlivých skupin: bílý – PBS, černý – ET-1, šedý – 4-Ala-ET-1, šedý vertikálně pruhovaný – BQ3020, bílý horizontálně pruhovaný – BQ123 + ET-1, bílý mřížkovaný – BQ788 + ET-1, bílý vertikálně pruhovaný – DMSO-PBS. Plochy pod křivkou neznázorňují nárůst nebo pokles RKP oproti bazální hladině, ale celkovou plochu pod křivkou (v absolutních hodnotách).

Signifikance ($p < 0,05$) hvězdička - v porovnání se skupinou s ET-1, **kruh** v porovnání se skupinou s BQ788 + ET-1. Jeden symbol odpovídá míře signifikance $p < 0,005$; dva symboly - $p < 0,01$; tři symboly - $p < 0,001$.

Experiment 4. Stanovení role ET_A a ET_B receptorů při změnách hladin metabolitů pomocí mikrodialýzy během fokální ischemie navozené aplikací ET-1 (40 pmol/1 μ l).

V dialyzátu jsme stanovovali hladinu glutamátu, dopaminu, alaninu, taurinu, argininu, GABA, aspartátu, citrulinu, glycinu a glutaminu. Počáteční (bazální) hodnoty zmíněných

metabolitů odpovídají fyziologickému rozmezí (viz obrázek č. 20), z technických důvodů jsme pouze u dopaminu byli nuceni měřit plochu pod křivkou.



Obrázek 20. Grafické zobrazení bazálních hodnot měřených metabolitů v jednotlivých mikrodialyzačních vzorcích.

Ala - alanin (n=9), **Asp** - aspartát (n=13), **Arg** - arginin (n=6), **Cit** - citrulin (n=9), **Dopa** - dopamin (n=10), **Gln** - glutamin (n=9), **Glu** - glutamát (n=8), **Gly** - glycin (n=12), **Tau** - taurin (n=9), **GABA** (n=14). Hladina bazálních hodnot je znázorněna jako plocha pod křivkou v absolutních hodnotách.

Černé kolečko znázorňuje koncentraci metabolitu v mikrodialyzačním vzorku pro jedno měření. **Červené přerušované čáry** zobrazují průměrnou bazální hodnotu pro konkrétní metabolit. **Modré čáry** označují standartní odchylky („standart deviation“).

a) Změny hladin metabolitů po aplikaci ET-1

Infuze endotelinu-1 (40 pmol/1 μ l; n=7) do pravého dorzálního hipokampu 12. denního potkana způsobila nárůst glutamátu, dopaminu, alaninu, taurinu a argininu oproti bazálním hodnotám po celou dobu měření (Obrázek č. 21). Hladina glutamátu vzrostla o 33 ± 10 % v průběhu 1. hodiny a o 70 ± 12 % během 2. hodiny po aplikaci. Dále infuze ET-1 vedla k nárůstu dopaminu o 80 ± 9 % a alaninu o 112 ± 18 % v průběhu 1. hodiny a během následující hodiny hladina dopaminu mírně klesla (v průměru o 11 % oproti 1. hodině), zatímco koncentrace alaninu mírně stoupla na 120 ± 26 %. Nejvyšší nárůst koncentrace byl zaznamenán u argininu, u kterého hladina po aplikaci enormně vzrostla o 499 ± 57 % po 1. hodině v porovnání s bazální hodnotou a v následující hodině mírně poklesla o 89 ± 24 % v porovnání s 1. hodinou.

Zároveň jsme zjistili, že intrahipokampální infuze ET-1 způsobila pokles GABA, aspartátu a citrulinu oproti bazálním hodnotám. Nejvyšší pokles byl zaznamenán u GABA, kde došlo ke snížení koncentrace oproti bazální hodnotě o 62 ± 5 % v průběhu 1. hodiny a o 54 ± 5 % během 2. hodiny po aplikaci. Hladina aspartátu po aplikaci klesla o 40 ± 5 % po dobu 2 hodin po aplikaci a koncentrace citrulinu po 1. hodině klesla o 25 ± 6 % a v průběhu 2. hodiny poklesla o dalších ~ 4 % (v průměru).

Infuze endotelinu mírně ovlivnila i koncentraci glycinu a glutaminu, avšak zaznamenali jsme pouze tendenci k poklesu glycinu o 29 ± 8 v průběhu 1. hodiny a o 13 ± 8 % během 2. hodiny v porovnání s bazální hladinou; v případě glutaminu jsme zaregistrovali tendenci k nárůstu koncentrace o 43 ± 21 % a o 35 ± 19 % během 1. a 2. hodiny po podání látky.

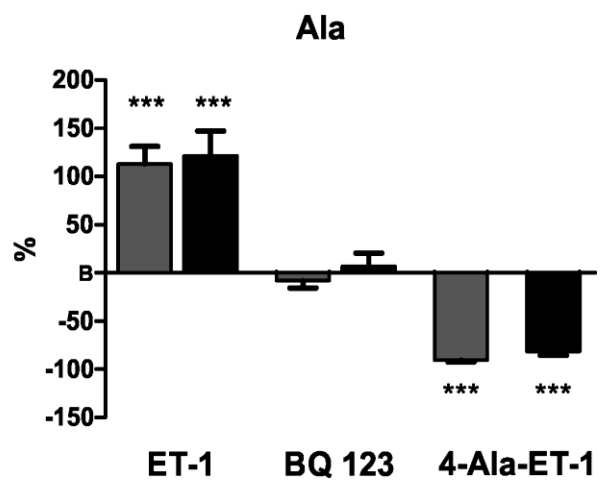
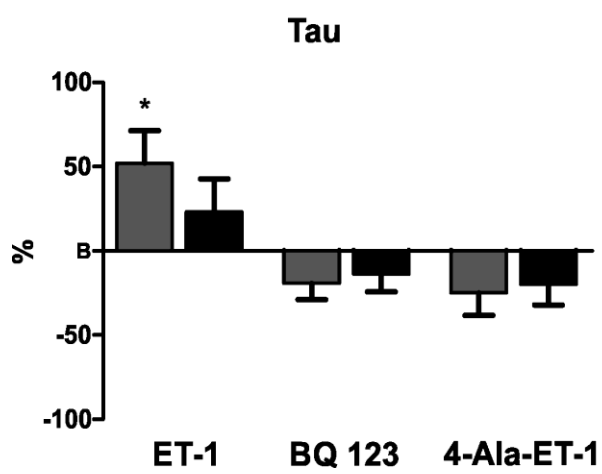
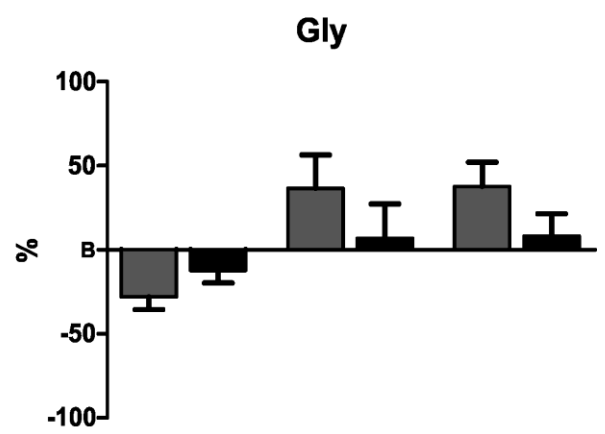
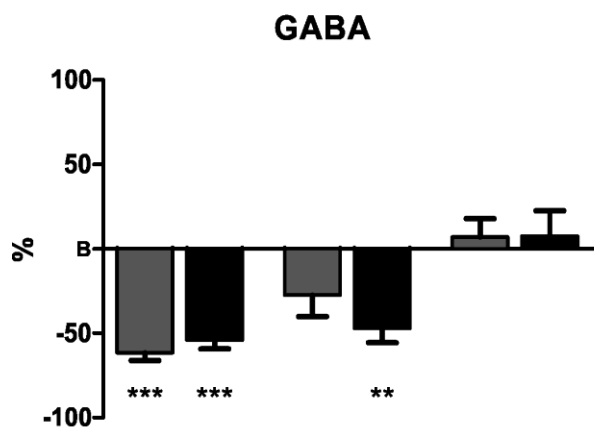
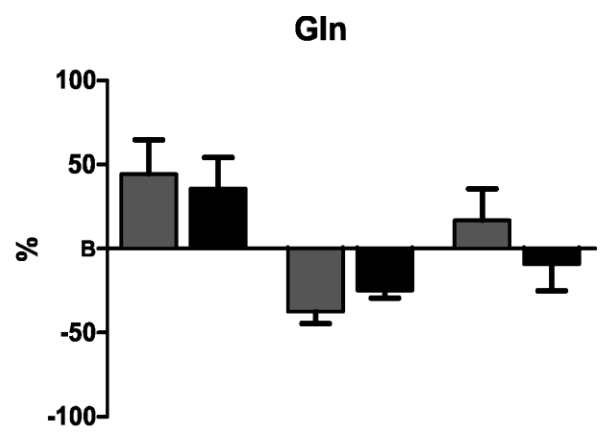
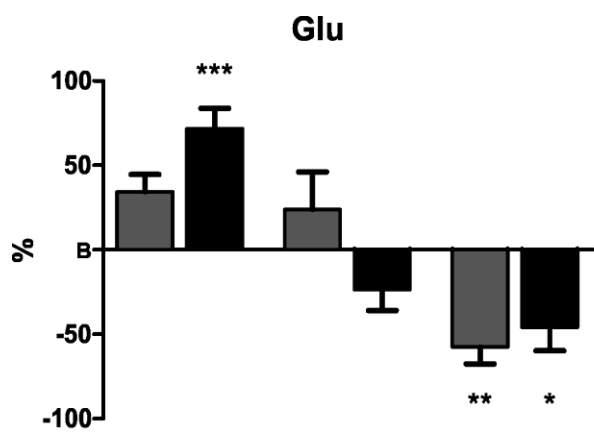
b) Změny hladin metabolitů po aplikaci selektivního antagonisty ET_A receptorů v kombinaci s endotelinem-1 (BQ123 + ET-1)

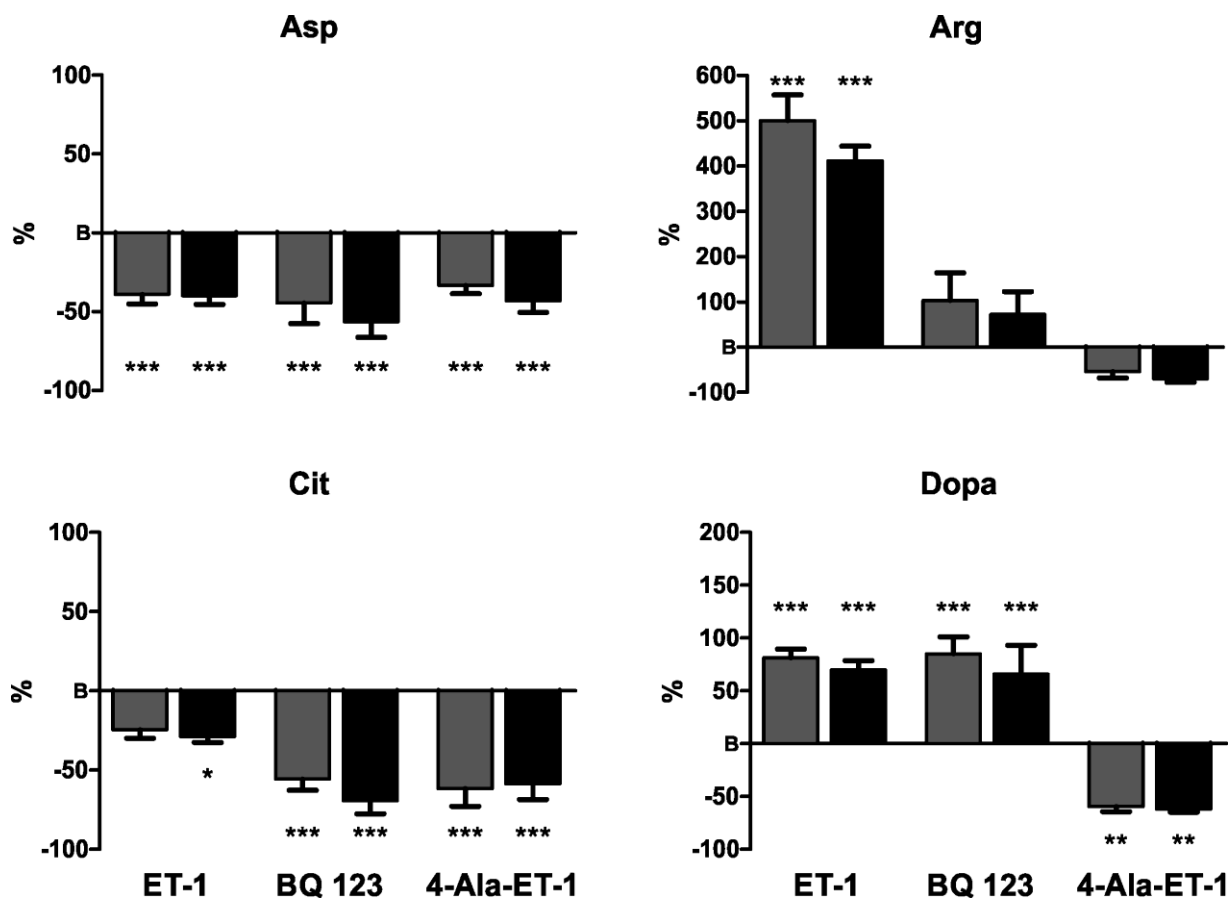
Po aplikaci selektivního antagonisty ET_A receptorů, BQ123 (70 nmol/1 μ l) + ET-1 (40 pmol/1 μ l; n=5) byl naměřen signifikantní nárůst hladiny dopaminu (o 80 ± 9 % po 1. hodině a o 69 ± 9 % po 2. hodině měření) a signifikantní pokles GABA, aspartátu a citrulinu. Koncentrace GABA klesla o 28 ± 13 % po 1. hodině až na 48 ± 9 % po 2. hodině měření. Pokles koncentrace citrulinu byl vyšší (57 ± 7 % 1. hod.; 70 ± 8 % 2. hod.) v porovnání s koncentrací aspartátu (45 ± 13 % 1. hod.; 57 ± 10 % 2. hod.) oproti bazální hladině.

Nesignifikantní pokles po aplikaci BQ123 + ET-1 byl naměřen u glutaminu ($38 \pm 7 \%$; $26 \pm 5 \%$) a taurinu ($20 \pm 10 \%$; $15 \pm 11 \%$) a nárůst u glycinu ($35 \pm 20 \%$) a argininu ($102 \pm 61 \%$) 1. hodinu po aplikaci s klesajícími tendencemi k bazálním hodnotám. Hladina alaninu se téměř nezměnila a koncentrace glutamátu 1. hodinu po aplikaci vystoupala na $23 \pm 22 \%$ a po 2. hodině klesla o $24 \pm 13 \%$ oproti bazálním hodnotám.

c) Změny hladin metabolitů po aplikaci selektivního agonisty ET_B receptorů (4-Ala-ET-1)

Aplikace 4-Ala-ET-1 (40 pmol/l μl ; $n=6$) způsobila signifikantní pokles glutamátu, dopaminu, alaninu, aspartátu a citrulinu. Nejvyšší pokles byl zaznamenán u alaninu: 1. hodinu po aplikaci o $92 \pm 2 \%$ a během 2. hodiny o $81 \pm 4 \%$ v porovnání s počáteční koncentrací. Srovnatelný pokles byl zjištěn u citrulinu (snížení o $63 \pm 11 \%$ - 1. hod.; o $60 \pm 10 \%$ - 2. hod.), dopaminu (snížení o $60 \pm 5 \%$ - 1. hod.; o $63 \pm 3 \%$ - 2. hod.) a glutamátu (snížení koncentrace o $58 \pm 10 \%$ - 1. hod.; o $47 \pm 14 \%$ - 2. hod.). Méně výrazný pokles byl zaznamenán u aspartátu o $34 \pm 5 \%$ během 1. hodiny po aplikaci, a o $44 \pm 7 \%$ během 2. hodiny v porovnání s bazální koncentrací. Nesignifikantní pokles byl naměřen u argininu (o $55 \pm 14 \%$ - 1. hod.; o $71 \pm 8 \%$ - 2. hod.) a taurinu (o $26 \pm 14 \%$ - 1. hod.; o $21 \pm 12 \%$ - 2. hod.). Hladina glycinu oproti tomu nesignifikantně vzrostla (o $37 \pm 7 \%$ 1. hod.) a 2. hodinu po aplikaci klesla téměř na bazální hodnotu. Na koncentraci GABA a glutaminu neměla infuze 4-Ala-ET-1 žádný výrazný vliv (Obrázek č. 21).





Obrázek 21. Grafické znázornění změn koncentrací stanovovaných metabolitů po infuzi ET-1 (40 pmol/1 μ l), BQ123 + ET-1 (70 nmol/1 μ l + 40 pmol/1 μ l), 4-Ala-ET-1 (40 pmol/1 μ l) oproti průměru bazálních hodnot (B).

Sloupce: šedé - po 1. hodině po aplikaci, černé - po 2. hodině po aplikaci

Ala - alanin, **Asp** - aspartát, **Arg** - arginin, **Cit** - citrulin, **Dopa** - dopamin, **Gln** - glutamin, **Glu** - glutamát, **Gly** - glycin, **Tau** - taurin

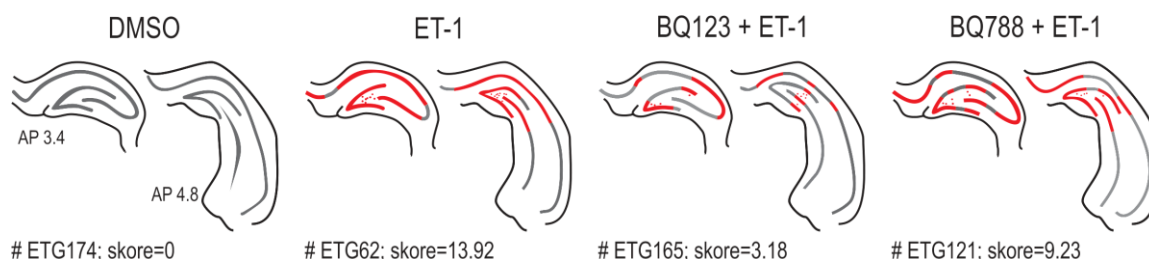
Změny jsou udány v procentech změn oproti průměru bazálních hodnot po 1. hodině a 2. hodině po aplikaci látek.

Celkové trvání experimentu: 160 minut.

Signifikance ($p < 0,05$) **hvězdička** - označuje signifikantní rozdíl v porovnání s bazální koncentrací. Jeden symbol odpovídá míře signifikance $p < 0,005$; dva symboly - $p < 0,01$; tři symboly - $p < 0,001$.

Experiment 5. Analýza degenerujících neuronů pomocí Fluoro-Jade B barvení po fokální ischemii

Výskyt a míra poškození byla asociována s rozvojem fokální ischemie (viz obrázek č. 22-24). Prostorová distribuce hipokampálního poškození nebyla uniformní (viz obrázek č. 22 a 23). Na Nisslovou metodou obarvených řezech (viz obrázek č. 23) vykazovaly poškozené oblasti hipokampu sníženou míru zabarvení a vakuolizace, což bylo více evidentní u „principal cells“ (hlavní buňky – excitační neurony), a to jak v pyramidové, tak i v granulární vrstvě. Typickým znakem také byla akumulace gliových buněk v poškozeném hipokampu (viz obrázek č. 23).



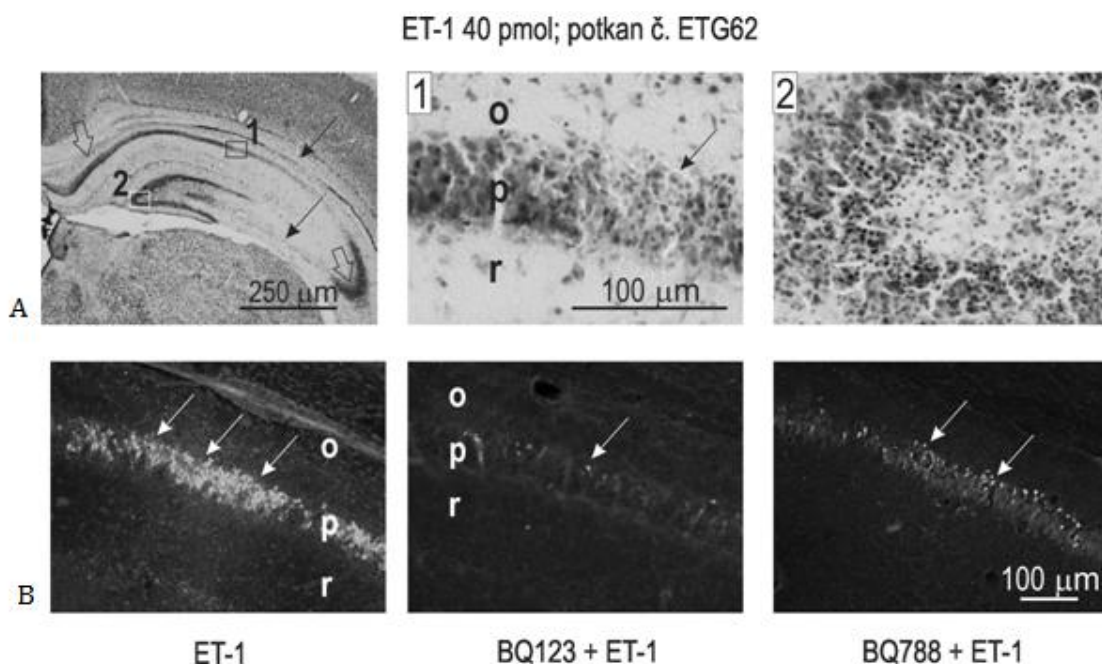
Obrázek 22. Schematické znázornění typického rozložení hipokampálního poškození 24 hodin po infuzi ET-1 (40 pmol/1 µl; zvíře č. #ETG62), DMSO (#ETG174), infuzi ET-1 (40 pmol/1 µl) + BQ123 (#ETG165) a ET-1 (40 pmol/1 µl) + BQ788 (#ETG121).

Poškození je rozsáhlejší po infuzi samotného ET-1 (skóre 13,92) než po infuzi ET-1 v kombinaci s BQ123 (skóre 3,18) nebo BQ788 (skóre 9,23). Infuze DMSO nezpůsobila žádné poškození (skóre 0). Všimněte si specifického rozložení poškození.

Červené linie symbolizují oblasti Fluoro-Jade B pozitivních buněčných těl, **šedé linie** demonstrují nepoškozené oblasti. Vzdálenosti AP 3,4 a AP 4,8 - odpovídají vzdálenosti AP u dospělého potkana podle Paxinos & Watson (1998).

Kontrolní zvířata, kterým byl podán PBS nebo DMSO, vykazovala velmi málo FJB pozitivních neuronů a to pouze v bezprostřední blízkosti místa zavedení kanyly pro infuzi látky/látek (Obrázek č. 23 a 24). Málo FJB pozitivních neuronů (v rozsahu $0,23 \pm 0,09$) se objevilo i u skupiny zvířat, kterým byl podán 4-Ala-ET-1 a to jak v případě koncentrace 10

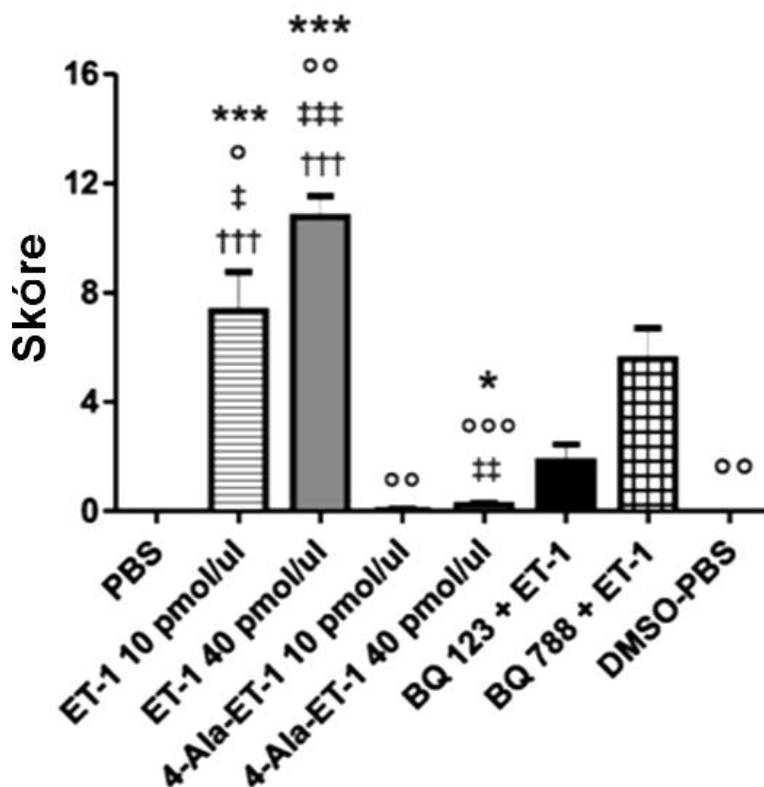
pmol/1 μ l, tak i 40 pmol/1 μ l (Obrázek č. 24). Zvířata, kterým byl infundován selektivní antagonist ET_A receptorů (BQ123) spolu s ET-1, vykazovala pouze malé poškození (v rozsahu $1,82 \pm 0,63$), signifikantně menší než u skupin se samotným ET-1 (10 pmol/1 μ l či 40 pmol/1 μ l). Oproti tomu skupiny zvířat, kterým byl podán samotný ET-1 v koncentraci 10 pmol/1 μ l nebo 40 pmol/1 μ l, stejně jako skupina, které byl infundován BQ788 (70 nmol/1 μ l) v kombinaci s ET-1 (40 pmol/1 μ l), vykazovaly značnou míru poškození, signifikantně vyšší v porovnání jak s odpovídající kontrolní skupinou, tak i s dalšími experimentálními skupinami (viz obrázek č. 22). Infuze ET-1 v koncentraci 10 pmol/1 μ l způsobila celkové poškození v rozsahu $6,9 \pm 1,4$ v době 24 hodin po infuzi a vyšší koncentrace (40 pmol/1 μ l) zapříčinila celkové poškození v rozsahu $9,99 \pm 1,16$. V případě BQ788 + ET-1 se jednalo o celkové poškození $5,44 \pm 1,32$ (Obrázek č. 24).



Obrázek 23. Mikrofotografie hipokampálních řezů po obarvení podle Nissla a po Fluoro-Jade B barvení.

A: světlá pole na mikrofotografiích barvených řezů Nisslovou metodou demonstrují buněčnou ztrátu a **černé šipky** označují doprovázející gliózu v CA1 oblasti (1) a *gyrus dentatus* (2) u 12. denních potkanů 24 hodin po podání ET-1 (40 pmol/1 μ l). **Prázdné šipky** označují normální neuronální buňky. **Čtverec** demonstruje oblast, kde byla pořízena fotografie vpravo.

B: Distribuce Fluoro-Jade B-pozitivních buněk (označeny bílou šipkou) u stejného zvířete v pyramidové vrstvě buněk CA1: **nalevo** - po infuzi samotného ET-1 (40 pmol/1 μ l); **uprostřed** - BQ123 (70 nmol/1 μ l) v kombinaci s ET-1 (40 pmol/1 μ l); **napravo** - BQ788 (70 nmol/1 μ l) v kombinaci s ET-1 (40 pmol/1 μ l).
o - *stratum oriens*, **p** - *stratum pyramidae*, **r** - *stratum radiatum*. **Měřítka** - A: 250 μ m; B: 100 μ m.



Obrázek 24. Porovnání míry neurodegenerace po podání nižších a vyšších koncentrací agonistů ET receptorů, antagonistů ET_A a ET_B receptorů, PBS a DMSO-PBS

Signifikance ($P < 0,05$) **hvězdička** - se skupinou s PBS, **kříž** - se skupinou s 4-Ala-ET-1 (10 pmol/ μ l, 40 pmol/ μ l), **dvojitý kříž** - se skupinou s BQ123 + ET-1 (40 pmol/1 μ l), **kruh** - se skupinou s BQ788 + ET-1 (40 pmol/1 μ l). Jeden symbol odpovídá míře signifikance $p < 0,005$; dva symboly - $p < 0,01$; tři symboly - $p < 0,001$.

9 Diskuze

Výsledky naší studie ukazují, že podání endotelinu-1 v koncentraci 40 pmol/μl do dorzálního hipokampu 12. denního potkana vyvolá fokální ischemii (*Mátéffyová et al., 2006; Tsenov et al., 2007*), což dokazuje pokles krevního průtoku (RKP) a saturace kyslíku (pO₂). Použitím antagonistů ET_A a ET_B receptorů byla zjištěna role jednotlivých receptorů ve vzniku fokální ischemie a souvisejících procesů. Důsledky aplikace ET-1 do mozkové tkáně, stejně jako role jednotlivých endotelinových receptorů (ET_A a ET_B) v cerebrální ischemii jsou relativně dobře popsány u dospělých zvířat (*Hama et al., 1997; Schaller, 2006*). Oproti tomu role endotelinových receptorů v nezralém mozku při cerebrální ischemii jsou ovšem v současné době neznámé. Abychom zabránili vzniku artefaktů spojenými s pohyby u volně pohyblivých zvířat během měření, prováděli jsme operace a měření pod izofuranovou anestezií, která mírně snižuje krevní tlak a zvyšuje krevní průtok (*Gelman et al., 1984*). Ze srovnávacích studií bylo zjištěno, že z hlediska funkční maturace mozku odpovídá mládě potkana staré 12 dní vývojovému stádiu novorozeného dítěte (*Dobbing, 1970*).

Měření regionálního krevního průtoku jsme prováděli pomocí Doplerova průtokoměru. Je nutné zmínit, že žádné předchozí studie neměřily změny regionálního krevního průtoku po aplikaci ET-1 u mláďat potkanů. Intrahipokampální podání ET-1 v dávce 40 pmol/μl (*Sharkey et al., 1993*) zapříčinilo hluboký a dlouhodobý pokles regionálního krevního průtoku, což je v souladu s pracemi aplikujícími endotelin-1 do frontoparietálního kortexu (*Fuxe et al., 1997*) nebo blízkosti střední cerebrální arterie (*Robinson et al., 1991; Bogaert et al., 2000*). Jelikož náš zájem byl vytvořit silnou, dlouhotrvající a zejména fokální ischemii, co nejpodobnější klinické ischemii, volili jsme optimální koncentraci 40 pmol/μl. Použití vyšších koncentrací, jak bylo zjištěno v dřívějších pilotních pokusech (*Tsenov et al., 2007*), by zvyšovalo riziko úmrtí v důsledku vzniku tonicko-klonických křečí. Pokles následoval i v případě zablokování ET_B receptorů (tj. po podání 70 nmol/μl BQ788 v kombinaci s 40 pmol/μl ET-1) téměř ihned po aplikaci látek. V případě podání selektivního antagonisty ET_A receptorů (70 nmol/μl BQ123) v kombinaci s ET-1, PBS nebo selektivních agonistů (4-Ala-ET-1 nebo BQ3020) nedocházelo k žádnému poklesu. Ovšem u kontrolních zvířat po aplikaci 0,01% DMSO-PBS

byl pozorován mírný nárůst. Podle review Jacoba a Herschlera (1986) způsobuje DMSO mírnou vazodilataci a myorelaxaci, což potvrzují naše výsledky.

S ischemií dochází zároveň k hypoxii v dané oblasti. Proto jsme očekávali podobné výsledky měření hladiny extracelulárního kyslíku u jednotlivých skupin jako v případě měření RKP. Po podání samotného endotelinu nebo selektivního antagonisty ET_B receptorů v kombinaci s ET-1 skutečně došlo k výraznému poklesu hladiny extracelulárního kyslíku. Tyto výsledky jsou v souladu s publikovanými daty studií ischemie provedenými na kortexu dospělých zvířat (*Chi et al., 1999; Narayanan et al., 2002*). V případě podání antagonisty ET_B + ET-1 byl pozdější nárůst na původní hodnoty rychlejší (1,5 hodiny po aplikaci) než v případě podání samotného endotelinu-1, kdy za stejnou dobu hodiny po aplikaci bylo dosaženo pouze 50 % původních hodnot. Nárůst extracelulárního kyslíku v těchto případech byl (přestože byla prokázána trvající ischemie), předpokládáme, způsoben difuzí kyslíku z nepostižených cév či celkovou anestezií (*Alkire et al., 1997*), která snižuje metabolismus a tím i spotřebu kyslíku buňkami. Mírný pokles byl zaznamenán po podání PBS, agonistů ET_B receptorů (4-Ala-ET-1 a BQ3020) a selektivního antagonisty ET_A receptorů (BQ123 v kombinaci s ET-1). Po podání DMSO došlo naopak k mírnému nárůstu hladiny kyslíku.

Naše data ukazují, že aktivace ET receptorů typu A způsobuje silný pokles krevního průtoku, související hypoxii a následnou fokální ischemii, zatímco ET_B receptory mají spíše modulační roli. Potvrzení těchto skutečností bude dosaženo s použitím selektivního agonisty ET_A receptorů, který nyní bohužel není komerčně dostupný.

Součástí této práce bylo zjistit vliv ET-1 indukované ischemie na hladinu aminokyselin v nezralém hipokampu. Je nutno podotknout, že vliv endotelinem indukované ischemie na hladinu aminokyselin u mláďat potkanů nebyl předtím nikdy měřen, zároveň mikrodialyzační studie, ve kterých byl využit ET-1 infundovaný v blízkosti MCA či do mozkové kůry, byly provedené u dospělých zvířat a metabolické změny byly sledované buď v kůře, či ve striatu (*Bogaert et al., 2000; van Hemelrijck et al., 2003*). Z tohoto důvodu jsou naše výsledky jedinečné a jisté diskutované odlišnosti lze připisovat jak věku použitých zvířat, tak sledované struktuře a v neposlední řadě míře/rozsahu ischemie, která je nepochybně vyšší v modelu MCAO.

Ze studií zabývajících účinkem ischemie indukované u dospělých zvířat na metabolické změny (Bogaert *et al.*, 2000; van Hemelrijck *et al.*, 2003) vyplívá, že po ischemii dochází k mnohonásobnému zvýšení koncentrací excitačního (glutamátu) a zároveň inhibičních neurotransmiterů (GABA, taurinu) a katecholaminu dopaminu. Zvýšená koncentrace extracelulárního glutamátu vzniká v důsledku zvýšeného výlevu glutamátu (Glu) do synaptické štěrbině (Sasaki *et al.*, 1997) a snížení reuptaku Glu gliemi během endotelinem indukované ischemie (Leonova *et al.*, 2001). V naší studii byl zjištěn nárůst neurotransmiterů, glutamátu a dopaminu, do 2 hodin po ischemii, což se shoduje s výsledky studií na volně pohyblivých dospělých zvířatech Bogaerta a kolektivu z roku 2000 (po intrastriální aplikaci 120 pmol ET-1). Z našich výsledků vyplívá, že míra nárůstu glutamátu po ischemii vyvolané intrahipokampální infuzí ET-1 je v nezralém mozku mnohem nižší ve srovnání s nárůstem v dospělém mozku. Toto zjištění je ve shodě s dříve publikovaným výsledkem studie Oja a Saransaariho (2013). Nižší vzestup koncentrace glutamátu v nezralém v porovnání s dospělým mozkem může být zapříčiněn např. rychlejším vyčerpáním glutamátu neurony, stimulací menšího počtu neuronů pro výlev glutamátu, vyšším tzv. ředícím efektem vzhledem k většímu množství extracelulární tekutiny v nezralém mozku apod. (Gordon *et al.*, 1991). Vzestup hladiny glutamátu na excitotoxickou úroveň a podíl dopaminu na tvorbě kyslíkových radikálů se podílí na neuronálním postischemickém poškození, což potvrzuje námi zjištěný nárůst dopaminu a glutamátu a také neuronální poškození u skupiny po podání antagonisty ET_A receptorů (BQ123 + ET-1) a zejména po aplikaci samotného endotelinu. U skupiny po podání 4-Ala-ET-1, u které na základě měření RKP a pO₂ v samostatných experimentech nedošlo k ischemii, došlo k poklesu glutamátu a dopaminu a souvislost těchto neurotransmiterů s mírou neurodegenerace potvrzují i výsledky FJB barvení, které neprokázaly žádné neuronální poškození. Tyto výsledky tedy potvrzují naši hypotézu, že míra neuronálního poškození koreluje s mírou nárůstu extracelulárního glutamátu. Rovněž naši hypotézu potvrzují autoři studie, ve které 12. denním potkanům bylo po fokální ischemii vyvolané intrahipokampální infuzí ET-1 (40 pmol/1 µl) aplikován neuroaktivní steroid 3α,5β-pregnanolon glutamát, který působí jako „use-dependentní“ NMDA antagonist (Kleteckova *et al.*, 2014) a výrazně snižuje míru poškození tím, že mírní/blokuje excitotoxické účinky glutamátu.

Kontroverzním zjištěním byl pokles hladiny aspartátu u všech experimentálních skupin, což je v rozporu s výsledky studií zabývajících se hypoxicko-ischemickým poškozením u novorozenců (*Güçüyener et al., 1999*) i mláďat laboratorních zvířat (*Andiné et al., 1991a; Puka-Sundvall et al., 1997*), kde autoři uvádějí, že hladina aspartátu po ischemii stoupá. Předpokládáme, že pokles aspartátu u našich experimentálních skupin může být způsoben endotelinem samotným. Jelikož nejsou žádné studie zabývající se přímým vlivem endotelinu na hladinu aspartátu, bude potřeba dalšího výzkumu v této oblasti.

Glutamin je derivátem glutamátu vznikající v astrocytech energeticky náročnou konverzí s amoniakem katalyzovanou glutamin syntázou. Z *in vitro* studií bylo zjištěno, že po akutní ischemii aktivita glutamin syntázy roste (*Petito et al., 1992*). Aktivita glutamin syntázy je negativně modulována NO, aktivitou NMDA receptorů (*Kosenko et al., 2003*), alaninem a glycinem. Ve studii Silversteina a kolektivu (1991) koncentrace glutaminu měřena v hipokampu po ischemii indukované ligací cerebrální karotidy u mláďate (7 dní starého) klesla. V našich experimentech jsme zaznamenali jeho nárůst a nelze vyloučit, že zjištěné odlišnosti mohou být důsledkem modelu. Na druhou stranu nárůst glutaminu může být projevem neuroprotektivního mechanismu, který vede ke snížení neurotoxicity způsobené akumulací amoniaku a glutamátu po ischemii. Zvýšená energeticky náročná produkce glutaminu indukuje myšlenku, že nezralý mozek využívá jiný energetický substrát, který není dopravován krevním řečištěm, např. laktát. Je nutno dodat, že v modelu ligace karotidy ipsilaterálně přetrvává residuální krevní perfuze (*Silverstein et al., 1984*), přerušení krevního průtoku je kompenzováno kolaterálními cévami (*Bronner et al., 1998*) a měření AK probíhá z větší vzdálenosti od jádra ischemie, než v našich experimentech, což by mohlo být důvodem rozdílných výsledků.

In vitro studie (*Oja a Saransaari, 2013*) a měření AK ve striatu nebo hipokampu po ligaci karotid (*Gordon et al., 1991; Silverstein et al., 1991; Andiné et al., 1991a; Puka-Sundvall et al., 1997*) u mláďat potkanů prokázaly signifikantní nárůst aspartátu, glutamátu, taurinu, alaninu, GABA a glycinu a pokles glutaminu. Několikanásobný nárůst inhibičních aminokyselin, který se objevuje v dospělém mozku po ischemii (*Globus et al., 1988; Bogaert et al., 2000*), vykazuje neuroprotektivní účinky (*Hutchinson et al., 2002*). Hladina inhibičních aminokyselin, GABA a glycinu, v našich experimentech vykazovala signifikantní snížení

oproti průměru bazálních hodnot. Můžeme předpokládat, že nesrovnalosti mezi výsledky hladin GABA a glycinu u mláďat a dospělých zvířat by mohly být způsobeny vývojovými procesy probíhajícími v nezralém mozku, zejména s přechodem excitačních účinků GABA na inhibiční (Ben-Ari, 2002). Aktivace GABA a glycinových receptorů v nezralém mozku vyvolává depolarizaci a zajišťuje excitační neurotransmisi. Snížení inhibičních AK indukuje myšlenky, že mláďata nemají žádný nebo mají odlišný mechanismus neuroprotektce po ischemii. Ze studie Zhao (2005) vyplývá, že GABA a glycin vykazují protektivní účinky pro maturované neurony, naopak pro nezralé neurony jsou toxické. Toto by mohl být způsob neuroprotektce v nezralém mozku a důvod poklesu inhibičních AK v našich experimentech. Zmíněný pokles inhibičních aminokyselin v nezralém mozku a tedy disbalance mezi excitací a inhibicí, by mohl mít za následek mj. i rozvoj ischemií indukovaných záchvatů.

Z *in vitro* experimentů bylo zjištěno, že excitační neurotransmise v nezralém mozku je zprostředkována GABA a glycinovými receptory a ne glutamátovými receptory (Qian *et al.*, 2014), jak je tomu u dospělých zvířat, u kterých glutamát představuje hlavní excitační neurotransmitter. Klíčovou roli v excitační neurotransmisi v nezralém mozku by tedy mohl hrát taurin, který se váže na oba tyto receptory (Qian *et al.*, 2014; Sava *et al.*, 2014). Zdá se, že by taurin mohl mít ve vyvíjejícím se mozku velmi důležitou roli (Sturman, 1993). Bylo prokázáno, že se v tělních tekutinách u mláďat potkanů vyskytuje ve vyšších koncentracích než v dospělém mozku (Oja & Saransaari, 2013) a má nutriční roli pro vývoj neurálních buněk, ovlivňuje migraci, axonální růst a laminizaci cerebrálního kortexu. K výlevu taurinu dochází stimulací neuronu a je zprostředkován ne vezikulární cestou jako u ostatních AK, konkrétně buď aniontovými kanály, nebo jinými mechanismy regulovanými neuronální aktivitou, proto je i clearance této peptidu pomalejší a vyšší hladina přetrvává delší dobu (Qian *et al.*, 2014). Při ischemii je výlev taurinu ovlivněn nárůstem glutamátu a představuje jeden z neuroprotektivních mechanismů při ischemii v nezralém mozku (Saransaari & Oja, 2003).

Alanin slouží jako přenašeč amonné skupiny mezi glutamátergními neurony a astrocyty, zdá se být preferenčně metabolizován astrocyty (Waagepetersen *et al.*, 2000) a spotřebován jako energetický substrát (Schousboe *et al.*, 2003). Vzniká přeměnou pyruvátu nebo glutamátu. Zvýšení hladiny alaninu je typické pro ischemické poškození (Erecińska *et al.*,

1984). V našich experimentech hladina alaninu po ischemii signifikantně vzrostla, naproti tomu u skupin zvířat, kde k ischemii nedošlo, se hladina buď nezměnila, nebo klesla.

Další molekulou přispívající k neuronálnímu poškození je oxid dusnatý (NO). Poměr citrulin/arginin je indikátorem produkce NO. Oxid dusnatý vytvořený eNOS (endoteliální NO syntáza) je pro své vazodilatační účinky součástí signální transdukce po aktivaci ET_B receptorů. Naproti tomu NO vytvořené nNOS (neuronální) nebo iNOS (imunitní) zejména při reperfuzi může působit jako radikál a přispívat k neuronálnímu poškození. Z *in vitro* studií bylo zjištěno, že exprese nNOS a eNOS po ischemii (do 3 hodin) u 12. denních potkanů vzrůstá (*van den Tweel et al., 2005*). NO syntáza katalyzuje přeměnu argininu na citrulin a NO pouze za přítomnosti kyslíku a NADPH. Naše výsledky vykazují mírné zvýšení poměru Cit/Arg mezi 1. a 2. hodinou po aplikaci ET-1, což může být způsobeno faktem, že NOS je aktivována především v reperfuzní fázi (dostatek O₂), která v našich experimentech po podání 40 pmol/1 µl ET-1 nastává v plném rozsahu až 3 hodiny po aplikaci. Tento předpoklad nelze ovšem potvrdit bez dalšího zkoumání. Dále bylo pozorováno masivní zvýšení extracelulární koncentrace argininu, což potvrzují výsledky *in vitro* studií, ve kterých bylo zjištěno, že stimulace ionotropních non-NMDA receptorů glutamátem způsobuje výlev tohoto prekursoru NO (*Grima et al., 1997*). Dalším možným důvodem může být vyšší hladina glutaminu, která je prokázáno, inhibuje tvorbu NO a cGMP (*Arnal et al., 1995; Hilgier et al., 2008*) a limituje vstup argininu pro NO syntézu přes membránu (*Hilgier et al., 2009*). Zvýšená hladina argininu by měla stimulovat aktivitu NOS, ale vzhledem ke snížení koncentrace citrulinu v našich výsledcích se lze domnívat, že NOS a tvorba NO je aktivována, až v reperfuzní fázi.

Naše výsledky naznačují, že změny koncentrací metabolitů navozené ischemií, jsou ovlivněny modelem cerebrální ischemie (endotelinový model, příp. koncentrací ET-1, ligace karotid, MCAO apod.), vzdáleností sondy od jádra ischemie, druhem a věkem modelových zvířat a příp. probíhajícími vývojovými procesy. Naše výsledky jsou natolik jedinečné a ojedinělé, že jsou velmi těžko porovnatelné s ostatními studiemi.

Nárůst extracelulárního glutamátu na excitotoxickou úroveň se zdá být jednou z hlavních příčin buněčné smrti neuronů po cerebrální ischemii (*Choi & Rothman, 1990; Kleteckova et al., 2014*). Mezi další parametry, které mohou ovlivňovat následky cerebrální

ischemie a hypoxie patří typ ischemie (globální, fokální), druh živočicha, teplota mozku, integrita hematoencefalické bariéry, vytvoření edému, efekty jiných neurotransmiterů (*Choi & Rothman, 1990*), místo aplikace, koncentrace látek, lokální cévní zásobení či rychlost infuze látky/látek (*dle rev. Schaller, 2006*). Naše výsledky Fluoro-Jade B barvení histologického materiálu ukázaly koncentrační závislost dávky endotelinu-1 na velikost léze, což je v souladu Driscollovou studií (*Driscoll et al., 2008*). Míra neurodegenerace se objevila u skupin zvířat, kterým byl podán selektivní antagonist ET_B receptorů i selektivní antagonist ET_A receptorů. V případě zablokování ET_B receptorů byla míra poškození vyšší, což je v souladu s Chuquetovou studií (*Chuquet et al., 2002*).

10 Závěr

V této práci jsme se věnovali modelu fokální ischemie u mláďete potkana. Našimi cíly bylo zjistit roli ET_A a ET_B receptorů ve změnách saturace kyslíku a regionálního krevního průtoku při fokální ischemii vyvolané podáním endotelinu-1, dále zjistit míru neurodegenerace a změny hladin vybraných metabolitů v našem modelu. Pro navození ischemie jsme injikovali vazokonstrikční peptid, endotelin-1 (40 pmol/1 µl), do pravého dorzálního hipokampu 12. denního mláďete potkana. Pro zjištění rolí endotelinových receptorů jsme použili selektivní agonisty ET_B receptorů (BQ3020, 4-Ala-ET-1) a selektivní antagonisty ET_A receptorů (BQ123) a ET_B receptorů (BQ788). Zjistili jsme, že aplikace ET-1 vyvolává prokazatelnou a trvalou (90-120 minut) redukci regionálního krevního průtoku a s ní související koncentrace extracelulárního kyslíku. Stejný efekt byl vyvolán po podání antagonisty ET_B receptorů (BQ788). Tento poznatek svědčí o primární roli ET_A receptorů při vzniku fokální ischemie a následné rozsáhlé neurodegeneraci, zejména v oblasti *gyrus dentatus*.

Dalším úkolem této studie bylo objasnit, jak ischemie působí na hladinu vybraných metabolitů. Po aplikaci ET-1 došlo k vzestupu glutamátu na excitotoxickou úroveň, dále stoupla hladina dalšího neurotransmiteru, dopaminu. Hladiny inhibičních aminokyselin, př. GABA a glycinu, hodinu po ischemii naopak klesly. Tyto jedinečné výsledky potvrzují fakt, že se nezralý mozek od dospělého v mnoha aspektech liší. Problematika zralosti a funkce mediátorových systémů v nezralém mozku není zdaleka prozkoumaná. Z těchto důvodů je potřeba dalších studií, které objasní základní vývojovou fyziologii a patofyziologické aspekty hypoxicko-ischemického poškození nezralého mozku, které jsou klíčové pro vývoj účinné léčby.

Podařilo se nám potvrdit naši hypotézu, že klíčovou roli v rozvoji ischemického poškození hraje excitotoxicita glutamátu. Pochopení vztahů mezi ischemickým inzultem v raném věku a akutními změnami koncentrací metabolitů je důležitý krok nejen pro vývoj účinné léčby, ale i pro objasnění dlouhodobých neuropatologických důsledků. Proto bych se chtěla ve své navazující dizertační práci věnovat významu disbalance excitačních a inhibičních aminokyselin v modelech perinatálního poškození a jejich krátko- a dlouhodobým neurologickým následkům.

11 Literatura

- Agnati LF, Zoli M, Kurosawa M, Benfenati F, Biagini G, Zini I, Hallström A, Ungerstedt U, Toffano G, Fuxe K. (1991) **A new model of focal brain ischemia based on the intracerebral injection of endothelin-1.** Ital J Neurol Sci. Jun;12(3 Suppl 11):49-53.
- Alioğlu Z, Orem A, Bülbül I, Boz C, Ozmenoğlu M, Vanizor B. (2002) **Evaluation of plasma endothelin-1 levels in patients with cerebral infarction.** Angiology. Jan-Feb;53(1):77-82.
- Al-Jaberey Nahidh Addi Abdul-Shaheed, Jaffar Akram Abood, Al-Salihi Anam Rasheed. (2006) **Morphometry of the postnatal development of rat hippocampal capillaries.** J Fac Med Baghdad, Vol 48, No 4, 445-453
- Alkire MT, Haier RJ, Shah NK, Anderson CT. (1997) **Positron emission tomography study of regional cerebral metabolism in humans during isoflurane anesthesia.** Anesthesiology. Mar; 86(3):549-57.
- Anderson MF1, Blomstrand F, Blomstrand C, Eriksson PS, Nilsson M. (2003) **Astrocytes and stroke: networking for survival?** Neurochem Res. Feb;28(2):293-305.
- Andiné P, Sandberg M, Bågenholm R, Lehmann A, Hagberg H. (1991a) **Intra- and extracellular changes of amino acids in the cerebral cortex of the neonatal rat during hypoxic-ischemia.** Brain Res Dev Brain Res. Dec 17;64(1-2):115-20
- Andiné P1, Orwar O, Jacobson I, Sandberg M, Hagberg H. (1991b) **Changes in extracellular amino acids and spontaneous neuronal activity during ischemia and extended reflow in the CA1 of the rat hippocampus.** J Neurochem. Jul;57(1):222-9
- Angerio Angerio AD. (2006) **Endothelin-1-mediated inflammation in acute renal failure.** Crit Care Nurs Q. Apr-Jun;29(2):152-6.
- Arai H1, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. (1990) **Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor.** Nature. Dec 20-27;348(6303):730-2.
- Arnal JF1, Münzel T, Venema RC, James NL, Bai CL, Mitch WE, Harrison DG. (1995) **Interactions between L-arginine and L-glutamine change endothelial NO production. An effect independent of NO synthase substrate availability.** J Clin Invest. Jun;95(6):2565-72.
- Astrup J, Siesjö BK, Symon L. (1981) **Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra.** Stroke. Nov-Dec;12(6):723-5.
- Baba A. (1998) **Role of endothelin B receptor signals in reactive astrocytes.** Life Sci.;62(17-18):1711-5
- Barks JD, Silverstein FS. (1992) **Excitatory amino acids contribute to the pathogenesis of perinatal hypoxic-ischemic brain injury.** Brain Pathol. Jul;2(3):235-43.
- Barnes K, Turner AJ. (1999) **Endothelin converting enzyme is located on alpha-actin filaments in smooth muscle cells.** Cardiovasc Res. Jun;42(3):814-22.
- Barone FC, Globus MY, Price WJ, White RF, Storer BL, Feuerstein GZ, Busto R, Ohlstein EH. (1994) **Endothelin levels increase in rat focal and global ischemia.** J Cereb Blood Flow Metab. Mar;14(2):337-42.

- Baynash AG, Hosoda K, Giaid A, Richardson JA, Emoto N, Hammer RE, Yanagisawa M. (1994) **Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons.** *Cell*. Dec 30;79(7):1277-85.
- Ben-Ari Y. (1992) **Effects of anoxia and aglycemia on the adult and immature hippocampus.** *Biol Neonate*. 62(4): 225-30.
- Ben-Ari Y. (2002) **Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture.** *Nat Rev Neurosci*. Sep;3(9):728-39.
- Berthet C, Lei H, Thevenet J, Gruetter R, Magistretti PJ, Hirt L. (2009) **Neuroprotective role of lactate after cerebral ischemia.** *J Cereb Blood Flow Metab*. Nov;29(11):1780-9. doi: 10.1038/jcbfm.2009.97. Epub 2009 Jul 15
- Biernaskie J, Corbett D, Peeling J, Wells J, Lei H. (2001) **A serial MR study of cerebral blood flow changes and lesion development following endothelin-1-induced ischemia in rats.** *Magn Reson Med*. Oct;46(4):827-30.
- Blomstrand F, Giaume C, Hansson E, Rönnbäck L. (1999) **Distinct pharmacological properties of ET-1 and ET-3 on astroglial gap junctions and Ca(2+) signaling.** *Am J Physiol*. Oct;277(4 Pt 1):C616-27.
- Bogaert L, Scheller D, Moonen J, Sarre S, Smolders I, Ebinger G, Michotte Y. (2000) **Neurochemical changes and laser Doppler flowmetry in the endothelin-1 rat model for focal cerebral ischemia.** *Brain Res*. Dec 29;887(2):266-75.
- Brady Scott, Siegel George, Albers R. Wayne, Price Donald. (2011) **Basic neurochemistry. Principles of molecular, cellular and medical neurobiology.** 8th edition. Academic press. Waltham, MA, USA.
- Bronner G1, Mitchell K, Welsh FA. (1998) **Cerebrovascular adaptation after unilateral carotid artery ligation in the rat: preservation of blood flow and ATP during forebrain ischemia.** *J Cereb Blood Flow Metab*. Jan;18(1):118-21.
- Bugge E, Ytrehus K. (1996) **Endothelin-1 can reduce infarct size through protein kinase C and KATP channels in the isolated rat heart.** *Cardiovasc Res*. Nov;32(5):920-9.
- Buchan A, Pulsinelli WA. (1990) **Hypothermia but not the N-methyl-D-aspartate antagonist, MK-801, attenuates neuronal damage in gerbils subjected to transient global ischemia.** *J Neurosci*. Jan;10(1):311-6.
- Bullock R, Zauner A, Woodward J, Young HF. (1995) **Massive persistent release of excitatory amino acids following human occlusive stroke.** *Stroke*. Nov;26(11):2187-9.
- Butler TL1, Kassad CA, Sanberg PR, Willing AE, Pennypacker KR. (2002) **Neurodegeneration in the rat hippocampus and striatum after middle cerebral artery occlusion.** *Brain Res*. Mar 8;929(2):252-60.
- Cady EB1, Penrice J, Amess PN, Lorek A, Wylezinska M, Aldridge RF, Franconi F, Wyatt JS, Reynolds EO. (1996) **Lactate, N-acetylaspartate, choline and creatine concentrations, and spin-spin relaxation in thalamic and occipito-parietal regions of developing human brain.** *Magn Reson Med*. Dec;36(6):878-86.
- Callaway JK1, Lawrence AJ, Jarrott B. (2003) **AM-36, a novel neuroprotective agent, profoundly reduces reactive oxygen species formation and dopamine release in the striatum of conscious rats after endothelin-1-induced middle cerebral artery occlusion.** *Neuropharmacology*. May;44(6):787-800.

- Clozel M, Watanabe H. (1993) **BQ-123, a peptidic endothelin ETA receptor antagonist, prevents the early cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage after intracisternal but not intravenous injection.** Life Sci.;52(9):825-34.
- Cuzner M. Louise and Davison A.N. (1968) **The lipid composition of rat brain myelin and subcellular fractions during development .** Biochem J. January; 106(1): 29–34.
- Davenport AP. (2002) **International Union of Pharmacology. XXIX. Update on endothelin receptor nomenclature.** Pharmacol Rev. Jun;54(2):219-26.
- Dawson DA, Sugano H, McCarron RM, Hallenbeck JM, Spatz M. (1999) **Endothelin receptor antagonist preserves microvascular perfusion and reduces ischemic brain damage following permanent focal ischemia.** Neurochem Res. Dec;24(12):1499-505.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. (1999) **Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view.** Trends Neurosci. Sep;22(9):391-7.
- Dobbing J, Sands J. (1979) **Comparative aspects of the brain growth spurt.** Early Hum Dev. Mar;3(1):79-83.
- Dobbing J. (1970) **Undernutrition and the developing brain. The relevance of animal models to the human problem.** Am J Dis Child. Nov;120(5):411-5.
- Driscoll I¹, Hong NS, Craig LA, Sutherland RJ, McDonald RJ. (2008) **Enhanced cell death and learning deficits after a mini-stroke in aged hippocampus.** Neurobiol Aging. Dec;29(12):1847-58. Epub 2007 Jun 11.
- Erecińska M, Nelson D, Wilson DF, Silver IA. (1984) **Neurotransmitter amino acids in the CNS. I. Regional changes in amino acid levels in rat brain during ischemia and reperfusion.** Brain Res. Jun 18;304(1):9-22.
- Fang Q¹, Hu WW², Wang XF³, Yang Y⁴, Lou GD², Jin MM², Yan HJ², Zeng WZ⁴, Shen Y⁵, Zhang SH², Xu TL⁴, Chen Z⁶. (2014) **Histamine up-regulates astrocytic glutamate transporter 1 and protects neurons against ischemic injury.** Neuropharmacology. Feb;77:156-66. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.06.012. Epub 2013 Jun 18.
- Feldstein C, Romero C. (2007) **Role of endothelins in hypertension.** Am J Ther. Mar-Apr;14(2):147-53.
- Fernández-Durango R, de Juan JA, Zimman H, Moya FJ, Garcia de la Coba M, Fernández-Cruz A. (1994) **Identification of endothelin receptor subtype (ETB) in human cerebral cortex using subtype-selective ligands.** J Neurochem. Apr;62(4):1482-8.
- Foos TM, Wu JY. (2002) **The role of taurine in the central nervous system and the modulation of intracellular calcium homeostasis.** Neurochem Res. Feb;27(1-2):21-6.
- Fukuroda T, Fujikawa T, Ozaki S, Ishikawa K, Yano M, Nishikibe M. (1994) **Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats.** Biochem Biophys Res Commun. Mar 30;199(3):1461-5.
- Fuxe K, Kurosawa N, Cintra A, Hallström A, Gojny M, Rosén L, Agnati LF, Ungerstedt U. (1992) **Involvement of local ischemia in endothelin-1 induced lesions of the neostriatum of the anaesthetized rat.** Exp Brain Res.88(1):131-9.
- Fuxe, K., Bjelke, B., Andbjør, B., Grahn, H., Rimondini, R. & Agnati, L.F. (1997) **Endothelin-1 induced lesions of the frontoparietal cortex of the rat. A possible model of focal cortical ischemia.** Neuroreport, 8, 2623-2629

- Gadea A, Aguirre A, Haydar TF, Gallo V. (2009) **Endothelin-1 regulates oligodendrocyte development.** J Neurosci. Aug 12;29(32):10047-62. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0822-09.2009.
- Galie N, Manes A, Branzi A. (2004) **The endothelin system in pulmonary arterial hypertension.** Cardiovasc Res;61227-237
- Galiuto L, DeMaria AN, del Balzo U, May-Newman K, Flaim SF, Wolf PL, Kirchengast M, Iliceto S. (2000) **Ischemia-reperfusion injury at the microvascular level: treatment by endothelin A-selective antagonist and evaluation by myocardial contrast echocardiography.** Circulation. Dec 19;102(25):3111-6.
- Ganesan V1, Hogan A, Shack N, Gordon A, Isaacs E, Kirkham FJ. (2000) **Outcome after ischaemic stroke in childhood.** Dev Med Child Neurol. Jul;42(7):455-61.
- Gelman S, Fowler KC, Smith LR. (1984) **Regional blood flow during isoflurane and halothane anesthesia.** Anesth Analg. Jun;63(6):557-65.
- Giaid A, Gibson SJ, Herrero MT, Gentleman S, Legon S, Yanagisawa M, Masaki T, Ibrahim NB, Roberts GW, Rossi ML, et al. (1991) **Topographical localisation of endothelin mRNA and peptide immunoreactivity in neurones of the human brain.** Histochemistry.95(3):303-14.
- Gilmour G, Iversen SD, O'Neill MF, Bannerman DM. (2004) **The effects of intracortical endothelin-1 injections on skilled forelimb use: implications for modelling recovery of function after stroke.** Behavioural brain research; 150(1-2): 171-83.
- Ginsberg MD, Busto R. (1989) **Rodent models of cerebral ischemia.** Stroke. Dec;20(12):1627-42.
- Giuffrida R, Bellomo M, Polizzi G, Malatino LS. (1992) **Ischemia-induced changes in the immunoreactivity for endothelin and other vasoactive peptides in the brain of the Mongolian gerbil.** J Cardiovasc Pharmacol.20 Suppl 12:S41-4.
- Giza CC1, Hovda DA. (2001) **The Neurometabolic Cascade of Concussion.** Athl Train. Sep;36(3):228-235.
- Globus MY1, Busto R, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I, Ginsberg MD. (1988) **Effect of ischemia on the in vivo release of striatal dopamine, glutamate, and gamma-aminobutyric acid studied by intracerebral microdialysis.** J Neurochem. Nov;51(5):1455-64.
- Goldemund D., Mikulík R. (2007) **Nové poznatky o duální antiagregační terapii v prevenci cévní mozkové příhody.** Farmakoterapie, roč. 3, č. 2, s. 195-199. ISSN 1801-7509.
- Gordon KE1, Simpson J, Statman D, Silverstein FS. (1991) **Effects of perinatal stroke on striatal amino acid efflux in rats studied with in vivo microdialysis.** Stroke. Jul;22(7):928-32.
- Goto K, Hama H, Kasuya Y. (1996) **Molecular pharmacology and pathophysiological significance of endothelin.** Jpn J Pharmacol. Dec;72(4):261-90.
- Granger JP. (2003) **Endothelin.** Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. Aug;285(2):R298-301.
- Gregersen R1, Lambertsen K, Finsen B. (2000) **Microglia and macrophages are the major source of tumor necrosis factor in permanent middle cerebral artery occlusion in mice.** J Cereb Blood Flow Metab. Jan;20(1):53-65.
- Grima G1, Benz B, Do KQ. (1997) **Glutamate-induced release of the nitric oxide precursor, arginine, from glial cells.** Eur J Neurosci. Nov;9(11):2248-58.
- Gross PM1, Weaver DF. (1993) **A new experimental model of epilepsy based on the intraventricular injection of endothelin.** J Cardiovasc Pharmacol.;22 Suppl 8:S282-7.

- Gücüyener K1, Atalay Y, Aral YZ, Hasanoğlu A, Türkyilmaz C, Biberoglu G. (1999) **Excitatory amino acids and taurine levels in cerebrospinal fluid of hypoxic ischemic encephalopathy in newborn.** Clin Neurol Neurosurg. Sep;101(3):171-4.
- Hama H1, Kasuya Y, Sakurai T, Yamada G, Suzuki N, Masaki T, Goto K. (1997) **Role of endothelin-1 in astrocyte responses after acute brain damage.** J Neurosci Res. Mar 15;47(6):590-602
- Harada Noboru, Akihiko Himeno, Kazuto Shigematsu, Kohji Sumikawa, Masami Niwa. (2002) **Endothelin-1 Binding to Endothelin Receptors in the Rat Anterior Pituitary Gland: Possible Formation of an ET_A-ET_B Receptor Heterodimer.** Cellular and Molecular Neurobiology April, Volume 22, Issue 2, pp 207-226
- Haynes WG, Webb DJ. (1994) **Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone.** Lancet. Sep 24;344(8926):852-4.
- Hilgier W1, Freško I, Klemenska E, Beresewicz A, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J, Zielińska M. (2009) **Glutamine inhibits ammonia-induced accumulation of cGMP in rat striatum limiting arginine supply for NO synthesis.** Neurobiol Dis. Jul;35(1):75-81. doi: 10.1016/j.nbd.2009.04.004. Epub 2009 Apr 18.
- Hilgier W1, Wegrzynowicz M, Maczewski M, Beresewicz A, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J. (2008) **Effect of glutamine synthesis inhibition with methionine sulfoximine on the nitric oxide-cyclic GMP pathway in the rat striatum treated acutely with ammonia: a microdialysis study.** Neurochem Res. Feb;33(2):267-72. Epub 2007 Aug 29.
- Hillered L1, Hallström A, Segersvärd S, Persson L, Ungerstedt U. (1989) **Dynamics of extracellular metabolites in the striatum after middle cerebral artery occlusion in the rat monitored by intracerebral microdialysis.** J Cereb Blood Flow Metab. Oct;9(5):607-16.
- Hirata Y, Emori T, Eguchi S, Kanno K, Imai T, Ohta K, Marumo F. (1993) **Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells.** J Clin Invest. Apr;91(4):1367-73.
- Hodge, VJ.; Austin, J. (2004) **A Survey of Outlier Detection Methodologies.** Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Hocher B, Thöne-Reineke C, Bauer C, Raschack M, Neumayer HH. (1997) **The paracrine endothelin system: pathophysiology and implications in clinical medicine.** Eur J Clin Chem Clin Biochem. Mar;35(3):175-89.
- Horn T, Klein J. (2013) **Neuroprotective effects of lactate in brain ischemia: dependence on anesthetic drugs.** Neurochem Int. Feb;62(3):251-7. doi: 10.1016/j.neuint.2012.12.017. Epub 2013 Jan 5.
- Hossmann KA. (1999) **The hypoxic brain. Insights from ischemia research.** Adv Exp Med Biol;474:155-69.
- Hunter AJ, Green AR, Cross AJ. (1995) **Animal models of acute ischaemic stroke: can they predict clinically successful neuroprotective drugs?** Trends Pharmacol Sci. Apr;16(4):123-8.
- Hunter RB. (1977) **Causes of transient cerebral ischemia.** JAMA: the journal of the American Medical Association; 237(23): 2472.
- Hutchinson PJ1, O'Connell MT, Al-Rawi PG, Kett-White CR, Gupta AK, Maskell LB, Pickard JD, Kirkpatrick PJ. (2002) **Increases in GABA concentrations during cerebral ischaemia: a**

- microdialysis study of extracellular amino acids.** J Neurol Neurosurg Psychiatry. Jan;72(1):99-105.
- Hutchison JS, Ichord R, Guerguerian AM, deVeber G. (2004) **Cerebrovascular disorders, Seminars in Pediatric Neurology**, Volume 11, Issue 2, June, Pages 139-146
- Hyndman KA, Miyamoto MM, Evans DH. (2009) **Phylogeny, taxonomy, and evolution of the endothelin receptor gene family.** Mol Phylogenet Evol. Sep;52(3):677-87. doi: 10.1016/j.ympev.2009.04.015. Epub 2009 May 3.
- Chauhan BC. (2008) **Endothelin and its potential role in glaucoma.** Can J Ophthalmol. Jun;43(3):356-60. doi: 10.3129/i08-060.
- Chew BH, Weaver DF, Gross PM. (1995) **Dose-related potent brain stimulation by the neuropeptide endothelin-1 after intraventricular administration in conscious rats.** Pharmacology, biochemistry, and behavior; 51(1): 37-47.
- Chi OZ, Chang Q, Wang G, Liu X, Weiss HR. (1999) **A nonNMDA antagonist, GYKI 52466 improves microscopic O2 balance in the cortex during focal cerebral ischemia.** *Neurological research*; 21(3): 299-304.
- Choi DW, Rothman SM. (1990) **The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death.** Annu Rev Neurosci.;13:171-82.
- Chuquet J1, Benchenane K, Toutain J, MacKenzie ET, Roussel S, Touzani O. (2002) **Selective blockade of endothelin-B receptors exacerbates ischemic brain damage in the rat.** Stroke. Dec;33(12):3019-25
- Ihara M, Ishikawa K, Fukuroda T, Saeki T, Funabashi K, Fukami T, Suda H, Yano M. (1992) **In vitro biological profile of a highly potent novel endothelin (ET) antagonist BQ-123 selective for the ETA receptor.** J Cardiovasc Pharmacol.;20 Suppl 12:S11-4.
- Ishikawa K, Ihara M, Noguchi K, Mase T, Mino N, Saeki T, Fukuroda T, Fukami T, Ozaki S, Nagase T, et al. (1994) **Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788.** Proc Natl Acad Sci U S A. May 24;91(11):4892-6.
- Jacob SW, Herschler R. (1986) **Pharmacology of DMSO.** Cryobiology. Feb;23(1):14-27.
- Jourdain P1, Nikonenko I, Alberi S, Muller D. (2002) **Remodeling of hippocampal synaptic networks by a brief anoxia-hypoglycemia.** J Neurosci. Apr 15;22(8):3108-16.
- Kader A1, Frazzini VI, Solomon RA, Trifiletti RR. (1993) **Nitric oxid production during focal cerebral ischemia in rats.** Stroke. Nov;24(11):1709-16.
- Kalani M. (2008) **The importance of endothelin-1 for microvascular dysfunction in diabetes.** Vasc Health Risk Manag.4(5):1061-8.
- Kedzierski RM, Yanagisawa M. (2001) **Endothelin system: the double-edged sword in health and disease.** Annu Rev Pharmacol Toxicol.41:851-76.
- Khodorova A., Montmayeur JP,* and Strichartz G. (2009) **Endothelin receptors and pain,** J Pain. January; 10(1): 4-28.
- Kleteckova L1, Tsenov G2, Kubova H2, Stuchlik A3, Vales K4. (2014) **Neuroprotective effect of the 3 α 5 β -pregnanolone glutamate treatment in the model of focal cerebral ischemia in immature rats.** Neurosci Lett. Feb 7;564C:11-15. doi: 10.1016/j.neulet.2014.01.057.
- Ko C, Gieske MC, Al-Alem L, Hahn Y, Su W, Gong MC, Iglarz M, Koo Y. (2006) **Endothelin-2 in ovarian follicle rupture.** Endocrinology. Apr;147(4):1770-9. Epub 2006 Jan 12.

- Koh E, Morimoto S, Kim S, Nabata T, Miyashita Y, Ogihara T. (1990) **Endothelin stimulates Na⁺/H⁺ exchange in vascular smooth muscle cells.** *Biochem Int.*20(2):375-80
- Kosenko EI, Llansola M, Montoliu C, Monfort P, Rodrigo R, Hernandez-Viadel M, Erceg S, Sánchez-Perez AM, Felipe V. (2003) **Glutamine synthetase activity and glutamine content in brain: modulation by NMDA receptors and nitric oxide.** *Neurochem Int.* Sep-Oct;43(4-5):493-9.
- Kotila M, Waltimo O. (1992) **Epilepsy after stroke.** *Epilepsia.* May-Jun;33(3):495-8.
- Labat-gest V, Tomasi S. (2013) **Photothrombotic ischemia: a minimally invasive and reproducible photochemical cortical lesion model for mouse stroke studies.** *J Vis Exp.* Jun 9;(76). doi: 10.3791/50370.
- Larivière R, Lebel M. (2003) **Endothelin-1 in chronic renal failure and hypertension.** *Can J Physiol Pharmacol.* Jun;81(6):607-21. Review.
- Leonova J, Thorlin T, Aberg ND, Eriksson PS, Rönnbäck L, Hansson E. (2001) **Endothelin-1 decreases glutamate uptake in primary cultured rat astrocytes** *Am J Physiol Cell Physiol.* Nov;281(5):C1495-503.
- Loesch AI, Milner P, Burnstock G. (1998) **Endothelin in perivascular nerves. An electron-immunocytochemical study of rat basilar artery.** *Neuroreport.* Dec 1;9(17):3903-6.
- Loo LS, Ng YK, Zhu YZ, Lee HS, Wong PT. (2002) **Cortical expression of endothelin receptor subtypes A and B following middle cerebral artery occlusion in rats.** *Neuroscience.*112(4): 993-1000.
- Lustig HS, Chan J, Greenberg DA. (1992) **Comparative neurotoxic potential of glutamate, endothelins, and platelet-activating factor in cerebral cortical cultures.** *Neurosci Lett.* May 11;139(1):15-8.
- Lynch JK, Hirtz DG, DeVeber G, Nelson KB. (2002) **Report of the National Institute of Neurological Disorders and Stroke workshop on perinatal and childhood stroke.** *Pediatrics.* Jan;109(1):116-23.
- Lynch JK1, Nelson KB. (2001) **Epidemiology of perinatal stroke.** *Curr Opin Pediatr.* Dec;13(6):499-505.
- Mátéffyová A¹, Otáhal J, Tsenov G, Mares P, Kubová H. (2006) **Intrahippocampal injection of endothelin-1 in immature rats results in neuronal death, development of epilepsy and behavioral abnormalities later in life.** *Eur J Neurosci.* Jul;24(2):351-60. Epub 2006 Jul 12.
- Matsumoto H, Suzuki N, Onda H, Fujino M. (1989) **Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain.** *Biochem Biophys Res Commun.* Oct 16;164(1):74-80.
- McAuley MA. (1995) **Rodent models of focal ischemia.** *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* Summer;7(2):153-80
- McLarnon JG, Wang X, Bae JH, Kim SU. (1999) **Endothelin-induced changes in intracellular calcium in human microglia.** *Neurosci Lett.* Mar 19;263(1):9-12.
- McMichael MA, Lees GE, Hennessey J, Sanders M, Boggess M. (2005) **Serial plasma lactate concentrations in 68 puppies aged 4 to 80 days.** *Journal of veterinary Emergency and Critical Care.* 15(1) 2005, pp17-21
- Meyerson BA1, Linderöth B, Karlsson H, Ungerstedt U. (1990) **Microdialysis in the human brain: extracellular measurements in the thalamus of parkinsonian patients.** *Life Sci.*;46(4):301-8.

- Moe GW, Rouleau JL, Nguyen QT, Cernacek P, Stewart DJ. (2003) **Role of endothelins in congestive heart failure.** *Can J Physiol Pharmacol.* Jun;81(6):588-97.
- Mosqueda-Garcia R, Inagami T, Appalsamy M, Sugiura M, Robertson RM. (1993) **Endothelin as a neuropeptide. Cardiovascular effects in the brainstem of normotensive rats.** *Circ Res.* Jan;72(1):20-35.
- Murray CJ1, Lopez AD. (1997) **Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study.** *Lancet.* May 3;349(9061):1269-76.
- Nagasaka J, Tsuji M, Takeda H, Matsumiya T. (1999) **Role of endothelin receptor subtypes in the behavioral effects of the intracerebroventricular administration of endothelin-1 in conscious rats.** *Pharmacol Biochem Behav.* Sep;64(1):171-6.
- Narayanan U, Weiss HR, Liu X, Chi OZ. (2002) **Exogenous endothelin-1 improves microvascular oxygen balance during focal cerebral ischemia in the rat.** *Regulatory peptides;* 105(1): 1-7.
- Nilsson T1, Cantera L, Adner M, Edvinsson L. (1997) **Presence of contractile endothelin-A and dilatory endothelin-B receptors in human cerebral arteries.** *Neurosurgery.* Feb;40(2):346-51; discussion 351-3.
- Ohkita M, Tawa M, Kitada K, Matsumura Y. (2012) **Pathophysiological roles of endothelin receptors in cardiovascular diseases.** *J Pharmacol Sci.* Aug 18;119(4):302-13. Epub 2012 Jul 21.
- Oja SS1, Saransaari P. (2013) **Ischemia induces release of endogenous amino acids from the cerebral cortex and cerebellum of developing and adult mice.** *J Amino Acids.*;2013:839036. doi: 10.1155/2013/839036. Epub 2013 Jan 10.
- Patel TR, Galbraith S, Graham DI, Hallak H, Doherty AM, McCulloch J. (1996) **Endothelin receptor antagonist increases cerebral perfusion and reduces ischaemic damage in feline focal cerebral ischaemia.** *J Cereb Blood Flow Metab.* Sep;16(5):950-8.
- Paxinos G, Watson C. (1998) **A stereotaxic atlas of the rat brain,** Academic, New York
- Perez Velazquez JL1, Kokarovtseva L, Sarbaziha R, Jeyapalan Z, Leshchenko Y. (2006) **Role of gap junctional coupling in astrocytic networks in the determination of global ischaemia-induced oxidative stress and hippocampal damage.** *Eur J Neurosci.* Jan;23(1):1-10.
- Petito CK1, Chung MC, Verkhovsky LM, Cooper AJ. (1992) **Brain glutamine synthetase increases following cerebral ischemia in the rat.** *Brain Res.* Jan 13;569(2):275-80.
- Puka-Sundvall M, Sandberg M, Hagberg H. (1997) **Brain injury after hypoxia-ischemia in newborn rats: relationship to extracellular levels of excitatory amino acids and cysteine.** *Brain Research March;* 750, (1–2): 325–328
- Qian T1, Chen R2, Nakamura M3, Furukawa T1, Kumada T4, Akita T1, Kilb W2, Luhmann HJ2, Nakahara D3, Fukuda A1. (2014) **Activity-dependent endogenous taurine release facilitates excitatory neurotransmission in the neocortical marginal zone of neonatal rats.** *Front Cell Neurosci.* Feb 10;8:33. doi: 10.3389/fncel.2014.00033. eCollection 2014.
- Rapoport RM1, Zuccarello M. (2011) **Endothelin(A)-endothelin(B) receptor cross-talk and endothelin receptor binding.** *J Pharm Pharmacol.* Nov;63(11):1373-7. doi: 10.1111/j.2042-7158.2011.01334.x. Epub 2011 Jul 19.
- Remuzzi G, Perico N, Benigni A. (2002) **New therapeutics that antagonize endothelin: promises and frustrations.** *Nat Rev Drug Discov.* Dec;1(12):986-1001.

- Reriani M, Raichlin E, Prasad A, Mathew V, Pumper GM, Nelson RE, Lennon R, Rihal C, Lerman LO, Lerman A. (2010) **Long-term administration of endothelin receptor antagonist improves coronary endothelial function in patients with early atherosclerosis.** *Circulation*. Sep 7;122(10):958-66. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.967406. Epub 2010 Aug 23.
- Richter CM. (2006) **Role of endothelin in chronic renal failure--developments in renal involvement.** *Rheumatology (Oxford)*. Oct;45 Suppl 3:iii36-8.
- Ripley, BD. (2004) **Robust statistics.** M.Sc. in Applied Statistics MT2004. 1992–2004 Springer-Verlag
- Robinson MJ1, Macrae IM, Todd M, Reid JL, McCulloch J. (1991) **Reduction in local cerebral blood flow induced by endothelin-1 applied topically to the middle cerebral artery in the rat.** *J Cardiovasc Pharmacol.*;17 Suppl 7:S354-7.
- Rogers SD, Demaster E, Catton M, Ghilardi JR, Levin LA, Maggio JE, Mantyh PW. (1997) **Expression of endothelin-B receptors by glia in vivo is increased after CNS injury in rats, rabbits, and humans.** *Exp Neurol*. May;145(1):180-95.
- Romijn HJ, Hofman MA, Gramsbergen A. (1991) **At what age is the developing cerebral cortex of the rat comparable to that of the full-term newborn human baby?** *Early Hum Dev*. Jul;26(1):61-7.
- Ros J1, Pecinska N, Alessandri B, Landolt H, Fillenz M. (2001) **Lactate reduces glutamate-induced neurotoxicity in rat cortex.** *J Neurosci Res*. Dec 1;66(5):790-4.
- Rothstein JD1, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kunc1 RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF. (1996) **Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate.** *Neuron*. Mar;16(3):675-86.
- Roubert P, Gillard V, Plas P, Chabrier PE, Braquet P. (1991) **Binding characteristics of endothelin isoforms (ET-1, ET-2, and ET-3) in vascular smooth muscle cells.** *J Cardiovasc Pharmacol.*;17 Suppl 7:S104-8.
- Rozyczka J, Figiel M, Engele J. (2004) **Endothelins negatively regulate glial glutamate transporter expression.** *Brain Pathol*. Oct;14(4):406-14.
- Rudolphi KA1, Schubert P, Parkinson FE, Fredholm BB. (1992) **Adenosine and brain ischemia.** *Cerebrovasc Brain Metab Rev*. Winter;4(4):346-69.
- Saransaari P1, Oja SS. (2003) **Characterization of N-methyl-D-aspartate-evoked taurine release in the developing and adult mouse hippocampus.** *Amino Acids*.;24(1-2):213-21.
- Sasaki Y1, Takimoto M, Oda K, Früh T, Takai M, Okada T, Hori S. (1997) **Endothelin evokes efflux of glutamate in cultures of rat astrocytes.** *J Neurochem*. May;68(5):2194-200.
- Sava BA, Chen R, Sun H, Luhmann HJ, Kilb W. (2014) **Taurine activates GABAergic networks in the neocortex of immature mice.** *Front Cell Neurosci*. Feb 4;8:26. doi: 10.3389/fncel.2014.00026. eCollection 2014.
- Sharkey J1, Ritchie IM, Kelly PA. (1993) **Perivascular microapplication of endothelin-1: a new model of focal cerebral ischaemia in the rat.** *J Cereb Blood Flow Metab*. Sep;13(5):865-71.
- Shichiri M, Hirata Y, Nakajima T, Ando K, Imai T, Yanagisawa M, Masaki T, Marumo F. (1991) **Endothelin-1 is an autocrine/paracrine growth factor for human cancer cell lines.** *J Clin Invest*. May;87(5):1867-71.

- Schaller BJ. (2006) **The role of endothelin in stroke: experimental data and underlying pathophysiology.** Arch Med Sci; 2, 3: 146-158
- Schmued LC1, Hopkins KJ. (2000) **Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration.** Brain Res. Aug 25;874(2):123-30.
- Schousboe A1, Sonnewald U, Waagepetersen HS. (2003) **Differential roles of alanine in GABAergic and glutamatergic neurons.** Neurochem Int. Sep-Oct;43(4-5):311-5
- Schurr A, Gozal E. (2012) **Aerobic production and utilization of lactate satisfy increased energy demands upon neuronal activation in hippocampal slices and provide neuroprotection against oxidative stress.** Front Pharmacol. Jan 13;2:96. doi: 10.3389/fphar.2011.00096. eCollection 2011.
- Schweizer A, Valdenaire O, Nelböck P, Deuschle U, Dumas Milne Edwards JB, Stumpf JG, Löffler BM. (1997) **Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with distinct subcellular localizations.** Biochem J. Dec 15;328 (Pt 3):871-7.
- Siesjö BK, Ekholm A, Katsura K, Theander S. (1990) **Acid-base changes during complete brain ischemia.** Stroke. Nov;21(11 Suppl):III194-9.
- Siesjö BK, Katsura K, Zhao Q, Folbergrová J, Pahlmark K, Siesjö P, Smith ML. (1995) **Mechanisms of secondary brain damage in global and focal ischemia: a speculative synthesis.** J Neurotrauma. Oct;12(5):943-56. Review.
- Siesjö BK. (1992) **Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology.** J Neurosurg. Aug;77(2):169-84.
- Silverstein F, Buchanan K, Johnston MV. (1984) **Pathogenesis of hypoxic-ischemic brain injury in a perinatal rodent model.** Neurosci Lett. Aug 31;49(3):271-7.
- Silverstein FS1, Naik B, Simpson J. (1991) **Hypoxia-ischemia stimulates hippocampal glutamate efflux in perinatal rat brain: an in vivo microdialysis study.** Pediatr Res. Dec;30(6):587-90.
- Simonson MS, Dunn MJ. (1990) **Endothelin-1 stimulates contraction of rat glomerular mesangial cells and potentiates beta-adrenergic-mediated cyclic adenosine monophosphate accumulation.** J Clin Invest. Mar;85(3):790-7
- Sirén AL, Knerlich F, Schilling L, Kamrowski-Kruck H, Hahn A, Ehrenreich H. (2000) **Differential glial and vascular expression of endothelins and their receptors in rat brain after neurotrauma.** Neurochem Res. Jul;25(7):957-69.
- Stenman E1, Malmjö M, Uddman E, Gidö G, Wieloch T, Edvinsson L. (2002) **Cerebral ischemia upregulates vascular endothelin ET(B) receptors in rat.** Stroke. Sep;33(9):2311-6.
- Steward O1, Falk PM. (1991) **Selective localization of polyribosomes beneath developing synapses: a quantitative analysis of the relationships between polyribosomes and developing synapses in the hippocampus and dentate gyrus.** J Comp Neurol. Dec 15;314(3):545-57.
- Sticherling M. (2006) **The role of endothelin in connective tissue diseases.** Rheumatology (Oxford). Oct;45 Suppl 3:8-10
- Strachan FE, Crockett TR, Mills NL, Gray GA, Webb DJ. (2000) **Constriction to ETB receptor agonists, BQ-3020 and sarafotoxin s6c, in human resistance and capacitance vessels in vivo.** Br J Clin Pharmacol. Jul;50(1):27-30.
- Sturman JA. (1993) **Taurine in development.** Physiol Rev. Jan;73(1):119-47.

- Tayag EC, Jeng AY, Savage P, Lehmann JC. (1996) **Rat striatum contains pure population of ETB receptors.** Eur J Pharmacol. Apr 11;300(3):261-5.
- Tsang MC, Lo AC, Chan TS, Chung SS, Chung SK. (2005) **Expression of a neuropeptide, endothelin-1 in pons and medulla of prenatal and perinatal mouse brains.** Int J Neurosci. Nov;115(11):1485-501.
- Tsenov G1, Mátéffyová A, Mares P, Otáhal J, Kubová H. (2007) **Intrahippocampal injection of endothelin-1: a new model of ischemia-induced seizures in immature rats.** Epilepsia.;48 Suppl 5:7-13.
- Unic A, Derek L, Hodak N, Marijancevic D, Cernja M, Serdar T, Krhac M, Romic Z. (2011) **Endothelins-- clinical perspectives.** Biochem Med (Zagreb).21(3):231-42.
- van den Tweel ER1, Nijboer C, Kavelaars A, Heijnen CJ, Groenendaal F, van Bel F. (2005) **Expression of nitric oxide synthase isoforms and nitrotyrosine formation after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain.** J Neuroimmunol. Oct;167(1-2):64-71
- Van Hemelrijck A, Hachimi-Idrissi S, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y. (2005a) **Neuroprotective effect of N-acetyl-aspartyl-glutamate in combination with mild hypothermia in the endothelin-1 rat model of focal cerebral ischaemia.** J Neurochem. Dec;95(5):1287-97. Epub 2005 Aug 31.
- Van Hemelrijck A, Hachimi-Idrissi S, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y. (2005b) **Post-ischaemic mild hypothermia inhibits apoptosis in the penumbral region by reducing neuronal nitric oxide synthase activity and thereby preventing endothelin-1-induced hydroxyl radical formation.** Eur J Neurosci. Sep;22(6):1327-37.
- Van Hemelrijck A1, Vermijlen D, Hachimi-Idrissi S, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y. (2003) **Effect of resuscitative mild hypothermia on glutamate and dopamine release, apoptosis and ischaemic brain damage in the endothelin-1 rat model for focal cerebral ischaemia.** J Neurochem. Oct;87(1):66-75.
- Vázquez-Rey E¹, Kaski JC. (2003) **Cardiovascular syndrome X and endothelial dysfunction.** Rev Esp Cardiol. Feb;56(2):181-92
- Verghese Mathew, M.D., David Hasdai, M.D., Amir Lerman, M.D. (1996) **The Role of Endothelin in Coronary Atherosclerosis.** Mayo Clinic Proceedings, August; 71(8); 769–777
- Waagepetersen HS1, Sonnewald U, Larsson OM, Schousboe A. (2000) **A possible role of alanine for ammonia transfer between astrocytes and glutamatergic neurons.** J Neurochem. Aug;75(2):471-9.
- Walsh TJ¹, Emerich DF. (1988) **The hippocampus as a common target of neurotoxic agents.** Toxicology. Apr;49(1):137-40.
- Wang-Fisher Y. (2008) **Manual of stroke models in rats.** CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL.
- Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD. (1985) **Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis.** Ann Neurol. May;17(5):497-504.
- Webb CM1, Ghatei MA, McNeill JG, Collins P. (2000) **17beta-estradiol decreases endothelin-1 levels in the coronary circulation of postmenopausal women with coronary artery disease.** Circulation. Oct 3;102(14):1617-22.

- Webber KM, Pennefather JN, Head GA, van den Buuse M. (1998) **Endothelin induces dopamine release from rat striatum via endothelin-B receptors**. Neuroscience. Oct;86(4):1173-80.
- Westerink B.H.C, Cremers T.I.F.H. (2007) **Handbook of microdialysis. Methods, applications and clinical aspects**. 1st edition. Academic press. London, UK.
- WHO (2002) **The world health report 2002 - Reducing Risks, Promoting Healthy Life**. World health organisation, France
- Williams DL Jr, Jones KL, Colton CD, Nutt RF. (1991) **Identification of high affinity endothelin-1 receptor subtypes in human tissues**. Biochem Biophys Res Commun. Oct 31;180(2):475-80.
- Wyss MT, Jolivet R, Buck A, Magistretti PJ, Weber B. (2011) **In vivo evidence for lactate as a neuronal energy source**. J Neurosci. May 18;31(20):7477-85. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0415-11.2011.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. (1988) **A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells**. Nature. Mar 31;332(6163):411-5.
- Yenari MA1, Han HS. (2012) **Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia**. Nat Rev Neurosci. Feb 22;13(4):267-78. doi: 10.1038/nrn3174.
- Yip AW1, Krukoff TL. (2002) **Endothelin-A receptors and NO mediate decrease in arterial pressure during recovery from restraint**. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. Mar;282(3):R881-9.
- Yoshizawa T, Shinmi O, Giaid A, Yanagisawa M, Gibson SJ, Kimura S, Uchiyama Y, Polak JM, Masaki T, Kanazawa I. (1990) **Endothelin: a novel peptide in the posterior pituitary system**. Science. Jan 26;247(4941):462-4.
- Zhang Z, Zhang RL, Jiang Q, Raman SB, Cantwell L, Chopp M. (1997) **A new rat model of thrombotic focal cerebral ischemia**. J Cereb Blood Flow Metab. Feb;17(2):123-35.
- Zhao P1, Qian H, Xia Y. (2005) **GABA and glycine are protective to mature but toxic to immature rat cortical neurons under hypoxia**. Eur J Neurosci. Jul;22(2):289-300.

Webové zdroje

<http://www.chemblink.com/products/117399-94-7.htm>

http://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB5117455_EN.htm

http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB0121062.htm

<http://www.microdialysis.se/us/products/products> - CMA catalog

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/e139?lang=en®ion=CZ>

<http://www.tocris.com/dispprod.php?ItemId=25176#.U2B8fumKDIU>

<http://www.tocris.com/dispprod.php?ItemId=1687#.U2B8X-mKDIU>

<http://www.tocris.com/dispprod.php?ItemId=1727#.U2B8HemKDIU>

http://en.wikipedia.org/wiki/File:Circle_of_Willis_en.svg

http://en.wikipedia.org/wiki/File:BQ-123_structure.svg

12 Přílohy

Příloha č. 1

Protokol barvení podle Nissla

- | | | |
|---------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-------------------|
| 1. 96% ethanol (fa Bioferm) + chloroform | 1:1 | 1 - 4 hod |
| 2. 100% ethanol | | 10 min |
| 3. 90% ethanol | | 10 min |
| 4. 70% ethanol | | 5 min |
| 5. destilovaná H ₂ O okyselená 0,25 ml CH ₃ COOH | krátký oplach | |
| 6. Kresol violet (Cresyl Violet acetate, C5042-10g, Sigma - Aldrich) | | 10 - 15 min |
| 7. oplach v destilované H ₂ O okyselené 0,25 ml CH ₃ COOH | oplach pod tekoucí vodou | |
| 8. 70% ethanol | | přibl. 3 min |
| 9. 90% ethanol + kontrola pod mikroskopem | | přibl. 3 min |
| 10. 100% ethanol | | přibl. 3 min |
| 11. 100% ethanol | | přibl. 3 min |
| 12. aceton : xylen | 2:1 | krátce |
| 13. aceton : xylen | 1:1 | krátce |
| 14. aceton : xylen | 1:2 | přibl. 2 min |
| 15. xylen | | 5 - 10 min |
| 16. xylen | | nejlépe do 2. dne |
| 17. montování krycích skel Solakrylem | | |

Příloha č. 2

Protokol barvení Fluoro-Jade B

1. řezy na sklech sušit přes noc při 37 °C
2. inkubace 3 min v absolutním ethanolu
3 min v 70% ethanolu
2 min v H₂O
15 min v 0,06% kalium permanganátum
2 min v H₂O
30 min v 0,001% FJB (Fluoro-Jade B-200mg, HISTO-CHEM INC., USA) v 0,1% kys. octové
černou krabičku zakrýt víčkem a dát na třepačku na mírné kývání 4-5
3. oplach 3 x 1 min v H₂O
4. sušit přes noc při 37 °C
5. odvodnit 3 x 2 min v xylenu
6. překrýt krycími sklíčky

Příloha č. 3

Protokol přípravy vzorku na mikrodialýzu

A. Vysrážení proteinu a naředění vzorku

1. Smíchat 40 μ l fyziologického vzorku s 10 μ l sulfosalicylové kyseliny. Poté promíchat na vortexu a stočit v centrifuze při 10 000 g 2 minuty.
2. Přenést 10 μ l supernatantu do čisté zkumavky a přidat 40 μ l barvicího pufru, obsahujícího norvalin. Poté promíchat, stočit a uschovat vzorek pro opětovné barvení nebo pro volitelnou allo-isoleucinovou analýzu (viz krok B5)
3. Přenést 10 μ l supernatantu do čisté zkumavky

B. Barvení vzorků aTRAQ reagentem $\Delta 8$

1. Nechat temperovat aTRAQ reagent $\Delta 8$ na pokojovou teplotu, poté stočit v centrifuze.
2. Přidat 70 μ l isopropanolu, promíchat a stočit
3. Ke vzorku z kroku A3 přidat 5 μ l naředěného aTRAQ reagentu $\Delta 8$, promíchat, stočit a inkubovat při pokojové teplotě min. 30 minut
4. Přidat 5 μ l hydroxylaminu a inkubovat při pokojové teplotě min. 15 minut
5. (volitelné) pro allo-isoleucinovou analýzu přidat 5 μ l naředěného supernatantu z kroku A2

C. Kombinace vzorku obarveného aTRAQ reagentem $\Delta 8$ s aTRAQ interním standartem

1. Stočit zkumavku s aTRAQ reagentem $\Delta 8$
2. Zředit aTRAQ reagent $\Delta 8$ přibližně 8 ml standartního ředícího roztoku a promíchat na vortexu dokud se neodstraní sraženina
3. Přidat 32 μ l zředěného aTRAQ interního standartního roztoku do každého vzorku obarveného aTRAQ reagentem $\Delta 8$, promíchat a stočit
4. Snížit objem vzorků na cca 30 μ l pomocí vakuového koncentrátoru nebo inertní plynové evaporace. Pokud je objem vzorku menší než 15 μ l, přidat 20 μ l vody
5. Analýza vzorků pomocí LC/MS/MS.